

Aus der Klinik für Dermatologie und Allergologie
Direktor: Prof. Dr. Michael Hertl
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

**Zytokinexpression peripherer mononukleärer Zellen
unter spezifischer Immuntherapie
bei Typ-I-Allergien der Atemwege**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Lea Bianka Mayer
aus Siegburg

Marburg 2019

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
14. Februar 2019

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer
Referent: Prof. Dr. Wolfgang Pfützner
Korreferent: Prof. Dr. Markus Schnare

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Inhaltsverzeichnis

.....	Seite
Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	IV
Zusammenfassung.....	VI
Summary	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Allergie.....	2
1.1.1 Allergietypen	2
1.1.2 Allergische Immunantwort des Typ-I-Allergikers	3
1.1.3 Pathophysiologie der Typ-I-Reaktion.....	4
1.2 Epidemiologie der Typ-I-Allergie	5
1.3 Immunsystem.....	6
1.3.1 T-Lymphozyten im Kontext der Typ-I-Allergie.....	6
1.3.2 Zytokine im Kontext der Typ-I-Allergie.....	8
1.4 Therapieformen bei allergischen Erkrankungen.....	13
1.4.1 Spezifische Immuntherapie	14
1.4.2 Präparate für die spezifische Immuntherapie.....	16
1.5 Ziel der Studie	17
2 Material.....	18
2.1 Probenmaterial.....	18
2.2 Lösungen und Zusätze für die Kultivierung humaner Zellen.....	18
2.3 Kulturmedien.....	18
2.4 Chemikalien.....	19
2.5 Proteinantigene.....	19
2.6 Kommerzielle Tests für die serologische Diagnostik.....	19
2.7 Verbrauchsartikel	19
2.8 Geräte	20
2.9 Software.....	21

3 Methoden	22
3.1 Patienten.....	22
3.1.1 Einschlusskriterien für die spezifische Immuntherapie.....	22
3.1.2 Ausschlusskriterien für die spezifische Immuntherapie.....	22
3.1.3 Studienprotokoll der spezifischen Immuntherapie	23
3.2 Klinische Evaluation.....	25
3.2.1 Hautpricktest	25
3.2.2 Klinischer Symptomscore	26
3.3 Zelluläre Diagnostik.....	26
3.3.1 Primärstimulation peripherer mononukleärer Blutzellen.....	26
3.3.2 Zellzahlbestimmung	27
3.4 Serologische Diagnostik	27
3.5 Statistik.....	30
4 Ergebnisse	31
4.1 Kinetik der allergenspezifischen Zytokinproduktion.....	31
4.2 Einfluss der spezifischen Immuntherapie auf Birkenpollenallergiker ..	33
4.2.1 Klinische Wirksamkeit der spezifischen Immuntherapie	33
4.2.2 Zytokinproduktion der Bet v 1-spezifischen T-Zellpopulationen	34
4.2.3 Anteil der Bet v 1-spezifischen Zytokinproduktion an der Gesamtheit der exprimierten Zytokine.....	38
4.2.4 Proportionale Veränderungen der Zytokinkonzentration unter der spezifischen Immuntherapie.....	40
4.3 Auswirkungen der natürlichen Allergenexposition auf Birkenpollenallergiker und gesunde Probanden	43
4.3.1 Schweregrad der allergischen Erkrankung unter saisonaler Birkenpollenexposition	43
4.3.2 Einfluss der natürlichen Allergenexposition auf die Zytokinproduktion	44
4.3.3 Proportionale Veränderungen der Zytokinfrequenz unter natürlicher Allergenexposition.....	48

5 Diskussion	50
5.1 Reevaluation des Studienprotokolls	51
5.2 Bewertung des ELISA-Verfahrens.....	52
5.3 Einfluss der spezifischen Immuntherapie auf die Immunantwort bei Typ-I-Allergien.....	54
5.3.1 Einfluss der spezifischen Immuntherapie auf die klinische Symptomatik	54
5.3.2 Veränderung der zellulären Zytokinproduktion unter spezifischer Immuntherapie	55
5.4 Die Frequenz Bet v 1-spezifischer T-Zellen im Vergleich zur quantitativen Zytokinanalyse.....	66
5.5 Wirkungen der Allergenexposition auf das Immunsystem von Nicht- Allergikern	68
5.6 Zusammenfassende Bewertung	69
6 Literaturverzeichnis	72
7 Tabellarischer Anhang	84
8 Schriftenverzeichnis	94
9 Verzeichnis akademischer Lehrer	96
10 Danksagung	97

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
BPA	Birkenpollenallergen
bzw.	beziehungsweise
CD	engl.: <i>cluster of differentiation</i> (Differenzierungskluster)
CO₂	Kohlendioxid
CPDA	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin
CS	engl.: <i>clinical score</i>
CTLA	engl.: <i>cytotoxic T lymphocyte antigen</i> (zytotoxisches T-Lymphozytenantigen)
d	engl.: <i>day</i> (Tag)
Da	Dalton
DC	engl.: <i>dendritic cell</i> (dendritische Zelle)
d.h.	das heißt
ELISA	engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
ELISPOT	engl.: <i>enzyme-linked immunospot assay</i> (enzymgekoppelter Immunospottest)
et al.	lat.: <i>et alii</i> (und andere)
FCS	engl.: <i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FcεR	Fc epsilon Rezeptor
Foxp3	engl.: <i>forkhead winged-helix transcriptional factor Box p3</i> (Transkriptionsfaktor Forkhead-Box-Protein P3)
g	Gramm
sh	Stunde(n)
IFNγ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
k	kilo
l	Liter
m	a) milli ($\times 10^{-3}$) b) Meter c) Monat

M	Molar
MAF	makrophagenaktivierender Faktor
MHC	engl. <i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute(n)
mRNA	engl.: <i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
n	nano ($\times 10^{-9}$)
N	Normal
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
OD	optische Dichte
p	a) Irrtumswahrscheinlichkeit b) piko ($\times 10^{-12}$)
PAF	plättchenaktivierender Faktor
PBMC	engl.: <i>peripheral blood mononuclear cells</i> (periphere mononukleäre Blutzellen)
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PD-1	engl.: <i>programmed death 1</i>
PHA	Phytohämagglutinin
PHS	engl.: <i>pooled human serum</i> (gepooltes Humanserum)
PMA	Phorbol Myristate Acetate
RCA	Rhinokonjunktivitis allergica
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	engl.: <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> (reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)
s	Sekunde(n)
SCIT	subkutane Immuntherapie
SIT	spezifische Immuntherapie
SLIT	sublinguale Immuntherapie
spp.	lat.: species pluralis

SQ	standardisierte Qualität
SRS-A	engl.: <i>slow reacting substance of anaphylaxis</i>
Tab.	Tabelle
Teff-Zelle	Effektor-T-Zelle
TGF	engl.: <i>transforming growth factor</i> (transformierender Wachstumsfaktor)
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg-Zelle	regulatorische T-Zelle
Tr1-Zelle	Typ-1-regulatorische T-Zelle
u.a.	unter anderem
us	unstimuliert
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
μ	mikro (x 10 ⁻⁶)

In der Arbeit verwendete englische Bezeichnungen (z.B. Eigennamen) sind kursiv dargestellt.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Regulatorische T- Zellen in der allergischen Immunantwort.....	8
Abb. 2: Therapieformen bei allergischen Erkrankungen vom Sofort-Typ.....	14
Abb. 3: Zeitlicher Ablauf des Studienprotokolls der spezifischen Immuntherapie	24
Abb. 4: Behandlungsplan mit verkürzter Aufdosierungsphase für ALK-depot SQ Pollen..	24
Abb. 5: Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA).....	29
Abb. 6: Bet v 1-spezifische Interleukin 5-Produktion	31
Abb. 7: Bet v 1-spezifische Interferon γ -Produktion.....	32
Abb. 8: Bet v 1-spezifische Interleukin 10-Produktion	32
Abb. 9: Klinische Symptomatik unter spezifischer Immuntherapie (SIT) mit Birkenpollenallergen.....	34
Abb. 10: Bet v 1-spezifische Interleukin 5-Produktion unter spezifischer Immuntherapie (SIT)	35
Abb. 11: Bet v 1-spezifische Interferon γ -Produktion unter spezifischer Immuntherapie...	36
Abb. 12: Bet v 1-spezifische Interleukin 10-Produktion unter spezifischer Immuntherapie (SIT)	37
Abb. 13: Allergenspezifische Zytokinproduktion unter spezifischer Immuntherapie (SIT) .	38
Abb. 14: Induktion der Interleukin 5-Produktion durch die spezifische Immuntherapie	39
Abb. 15: Induktion der Interferon γ -Produktion durch die spezifische Immuntherapie.....	39
Abb. 16: Induktion der Interleukin 10-Produktion durch die spezifische Immuntherapie ...	40
Abb. 17: Auswirkungen der spezifischen Immuntherapie (SIT) auf das Verhältnis von sezerniertem Interleukin 5 zu Interferon γ nach Bet v 1-Stimulation.....	41
Abb. 18: Auswirkungen der spezifischen Immuntherapie auf das Verhältnis von sezerniertem Interleukin 5 zu Interleukin 10 nach Bet v 1-Stimulation	42
Abb. 19: Klinische Symptomatik unter natürlicher Allergenbelastung	44
Abb. 20: Einfluss saisonaler Pollenexposition auf die Bet v 1-spezifische Interleukin 5- Konzentration.....	45
Abb. 21: Einfluss saisonaler Pollenexposition auf die Bet v 1-spezifische Interferon γ - Sekretion.....	46
Abb. 22: Einfluss saisonaler Pollenexposition auf die Bet v 1-spezifische Interleukin 10- Produktion.....	47

Abb. 23: Auswirkungen der natürlichen Allergenexposition auf das Verhältnis von Interleukin 5 zu Interferon γ	48
Abb. 24: Einfluss der natürlichen Allergenexposition auf das Verhältnis von Interleukin 5 zu Interleukin 10.....	49
Abb. 25: Frequenzanalyse Bet v 1-spezifischer T-Zellen unter spezifischer Immuntherapie (SIT)	67
Abb. 26: Wirkungsweise der spezifischen Immuntherapie auf die allergische Immunantwort	71

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Allergietypen nach Coombs und Gell	3
Tab. 2: Übersicht der Zytokine	9
Tab. 3: Kontraindikationen der subkutanen spezifischen Immuntherapie	23

Zusammenfassung

Die Birkenpollenallergie ist eine der meist verbreiteten Allergien in Europa. Sie zählt zu den Typ-I-Allergien, welche sich durch die Produktion allergenspezifischer Immunglobulin (Ig) E Antikörper auszeichnen, die rezeptorvermittelt an Effektorzellen der allergischen Immunantwort (eosinophile und basophile Granulozyten, Mastzellen) gebunden werden. Durch wiederholten Allergenkontakt kommt es zur Quervernetzung der IgE-Ak und Aktivierung der Effektorzelle mit Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren. Diese Entzündungsmediatoren lösen anschließend die Typ-I-Reaktion mit Symptomen wie Asthma bronchiale oder allergische Rhinokonjunktivitis aus.

Die spezifische Immuntherapie (SIT) stellt die einzige kausale Behandlungsmethode der Typ-I-Allergie dar. Ihre klinische Wirksamkeit und ihr präventiver Effekt wurden bereits in zahlreichen Studien belegt. Jedoch sind die zugrunde liegenden immunologischen Mechanismen zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abschließend geklärt.

Diese Studie untersuchte die Veränderungen immunologischer Parameter im peripheren Blut von elf Birkenpollenallergikern im Rahmen einer dreijährigen SIT. Im Speziellen sollten dabei Veränderungen auf Zytokinebene analysiert werden. Es wurde ein engmaschiges longitudinales Studienprotokoll gewählt, das einen Vergleich der Zytokinproduktion sowohl zu bestimmten Abschnitten der SIT (Einleitungs- und Erhaltungsphase) als auch innerhalb und außerhalb der Birkenpollensaison ermöglichte. Um den Einfluss des natürlichen Birkenpollenflugs bewerten zu können, wurden zusätzlich acht Probanden ohne Manifestation einer IgE-vermittelten Allergie sowie acht rein symptomatisch therapierte Allergiker in diese Studie inkludiert. Die Bewertung der klinischen Wirksamkeit der Therapie erfolgte dabei objektiv durch Hautpricktests und subjektiv durch die Einordnung des klinischen Beschwerdebildes durch die Patienten auf einer 7-Punkte-Skala. Die quantitative Messung der Zytokinmenge erfolgte mittels enzymgekoppeltem Immunadsorptionstests (ELISA).

Bereits in der ersten Pollensaison führte die Immuntherapie zu einer erkennbaren Verbesserung des klinischen Beschwerdebildes. Im weiteren Behandlungsverlauf stellte sich dann eine anhaltende signifikante Besserung der allergischen Symptome ein. Auch die Hautreaktion gegenüber dem Birkenpollenallergen zeigte sich ab dem ersten Jahr deutlich abgeschwächt. Entsprechende Veränderungen konnten bei symptomatisch therapierten Allergikern nicht festgestellt werden.

Die durch die SIT induzierten zellulären Modifikationen auf Zytokinebene wiesen eine ausgeprägte zeitliche Dynamik auf. Beginnend mit einem kurzzeitigen Anstieg der immunsuppressiven Interleukin (IL)-10-Sekretion in der ersten Pollenflugzeit, der von einer Zunahme der allergiefördernden IL-5-Produktion begleitet wurde, zeigte sich im weiteren Therapieverlauf eine kontinuierliche Reduktion des saisonal typischen IL-5-Anstiegs, welcher im dritten Behandlungsjahr signifikant gemindert vorlag. Die SIT hatte auf den insgesamt niedrigen Spiegel des als protektiv geltenden Zytokins Interferon (IFN) γ einen geringen Einfluss. Neben einer Reduktion am Ende der Einleitungsphase und in der dritten Birkenpollensaison ließ sich nach einem Jahr ein geringer Anstieg detektieren. Die viel propagierte Annahme, dass eine erfolgreiche SIT mit einem Wechsel von einer T-Helfer (Th) 2-Zell-medierten Immunantwort in ein Th1-Zell-dominiertes Verhältnis übergeht, konnte in der hier vorliegenden Studie somit nicht bestätigt werden. Vielmehr erscheint der Verlust einer Th2-Reaktivität entscheidend. Die Daten stützen zudem durch den transienten, wenn auch nur geringen IL-10-Anstieg in der Frühphase den möglichen Einfluss der regulatorischen T (Treg)- Zellen in der allergenspezifischen Toleranzentwicklung, insbesondere zu Beginn der SIT.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass die Toleranzinduktion durch die SIT bei Typ-I-Allergikern auf multifaktoriellen Mechanismen beruht, welche mit Induktion und Repression bestimmter Zytokine zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer ausgeprägten zeitlichen Dynamik unterliegen.

Summary

Birch pollen allergy is one of the most widespread allergies in Europe. It belongs to the type-I-allergies and is characterized by the production of allergen-specific immunoglobulin (Ig) E antibodies, which are bound by specific receptors on the surface of effector cells (eosinophilic and basophilic granulocytes, mast cells). Cross-linking of these receptors by repeated allergen contact results in cell activation with the release of proinflammatory mediators. These mediators initiate the type-I-reactions like bronchial asthma or allergic rhinitis.

The specific immunotherapy (SIT) is the only causative treatment of type-I-allergies. Both the clinical effectiveness and the preventive effect were demonstrated in various clinical trials. However, the underlying immunological mechanisms are still in focus of intensive research.

To detect alterations of immune parameters in peripheral blood the study was conducted with eleven patients allergic to birch pollen over the three year treatment period of SIT. In particular, main interest was on changes in cytokine levels. The closely meshed, long-term analysis enabled comparison of cytokine production at decisive time points of SIT (induction and maintenance phase) as well as in and out of birch pollen season. To evaluate the influence of natural birch pollen exposure eight subjects allergic to birch pollen treated only symptomatically and eight healthy individuals without manifestation of an IgE-mediated allergy were included in this work. Clinical efficacy was evaluated by skin prick test and by patients reporting the extent of allergic symptoms on a scale of 1 (no symptoms) to 7 (most severe symptoms). The quantitative measurement of the cytokine concentrations was performed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Already in the first pollen season an obvious improvement of allergic symptoms was detected. During the later course of treatment, SIT resulted in a significant reduction of allergic symptoms. After one year of treatment, patients revealed decreased pricktest reactivity against birch pollen allergen. In contrast, allergic subjects only treated symptomatically did not experience a similar relief of clinical symptoms.

Cellular alterations induced by SIT demonstrated strong temporal dynamics on the cytokine level. Initially, a transient increase of the immunosuppressive cytokine IL-10 was observed accompanied by parallel increases of allergy-promoting IL-5 in the first pollen season. At subsequent time points pollen induced seasonal increases of IL-5 ceased to appear, finally resulting in significantly diminished IL-5 levels at the end of the observation period. Constantly low levels of the protective cytokine interferon (IFN) γ were almost not affected by SIT. Besides a reduction at the end of the induction phase and in the third birch pollen season respectively, a slight increase was detected after the first treatment year. The common assumption that successful SIT is accompanied by a shift of a T helper (Th) 2-cell mediated to a Th1-cell dominated immune response was thus not confirmed by this study. Rather a loss of Th2 reactivity seems to be decisive. In addition, the transient increase of IL-10 release in the early phase supports a potential influence of regulatory T (Treg) cells in induction of tolerance against allergens, especially at the beginning of SIT.

In summary, this study shows that tolerance induction elicited by birch pollen SIT is based on multi-factorial immune mechanisms with distinctive temporal dynamics in induction and decrease of investigated cytokines at different time points.

1 Einleitung

Die wesentliche Aufgabe des Immunsystems ist es, den menschlichen Organismus vor Krankheitserregern zu schützen (Pezzutto et al., 2007). Sobald ein Keim die äußeren Körperbarrieren überwunden hat, wird er vom Immunsystem erkannt und bekämpft. Dies geschieht durch das Zusammenspiel der angeborenen unspezifischen Immunreaktion mit der erworbenen spezifischen Immunreaktion. Beide folgen meist unmittelbar aufeinander und sind funktionell eng miteinander verzahnt. Die unspezifische Immunreaktion ist in der Erbinformation festgelegt und kontinuierlich in Bereitschaft. Sie arbeitet mit Rezeptoren, die unspezifisch Fremddantigene von denen des eigenen Organismus unterscheiden können. Bei Kontakt mit einem unbekannten Antigen setzt die Abwehrreaktion sofort ein und aktiviert Phagozyten und das Komplementsystem. Gleichzeitig leitet diese frühe Immunreaktion die spezifische Immunantwort ein, welche sich gezielt gegen Antigene richtet. Dazu bilden Lymphozyten Rezeptoren, welche bei Kontakt mit dem passenden Antigen die Abwehrreaktion und die Bildung von spezifischen Antikörpern initiieren. Durch die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses setzt die spezifische Immunantwort bei Sekundärkontakt mit dem gleichen Erreger schneller und effektiver ein.

Bei einer Störung dieses feinen Zusammenspiels kann die Immunantwort fehlgeleitet werden und es kommt zur Schädigung des eigenen Körpers. Voraussetzungen dafür sind u.a. ein geeignetes Antigen und die Veranlagung zur übermäßigen Produktion antigenspezifischer Antikörperklassen oder T-Zellen. Bei der Autoimmunität sind Strukturen des eigenen Körpers Ziel der spezifischen Immunabwehr. Bei der Allergie sind es die in den Organismus aufgenommenen Umweltantigene wie Pollen oder Hausstaubmilben, die als Allergene bezeichnet werden. Nach Initiation einer allergischen Immunreaktion können abhängig vom Effektororgan und der Art der allergischen Reaktion unterschiedliche Symptome wie Rhinokonjunktivitis, Asthma, Ekzeme, Urtikaria, Ödeme, gastrointestinale Beschwerden (Diarrhoe, Erbrechen) oder sogar Herz-Kreislauf-Beschwerden im Zusammenhang mit einem anaphylaktischen Schock auftreten.

Neben einer Reihe symptomatischer Therapieformen stellt die spezifische Immuntherapie (SIT) die einzige Kausaltherapie gegen solch eine fehlgeleitete Immunreaktion dar. Hierbei wird dem Körper in zunehmender Dosis das ursächliche Antigen präsentiert, um schließlich durch ein langsames „Gewöhnen“ an das Antigen die Immunantwort zu normalisieren. Die klinische Effektivität der SIT wurde in einer Vielzahl von Studien bestätigt. 1998 wurde ihr therapeutischer Nutzen von der WHO anerkannt (Bousquet et al., 1998). Allerdings sind die immunologischen Wirkmechanismen der SIT auch über hundert Jahre nach der Erstbeschreibung durch Leonard Noon nicht vollständig bekannt, sondern im Fokus intensiver Forschung (Noon, 1911).

Mit dieser Studie sollten weitere Einblicke in die immunologischen Abläufe der SIT gewonnen werden. Dafür wurden die SIT-induzierten Veränderungen auf Zytokinebene in einer Gruppe von Birkenpollenallergikern über den Verlauf von drei Jahren untersucht und mit dem klinischen Therapieverlauf verglichen.

1.1 Allergie

Der Begriff "Allergie" (griech. Allos = anders, Ergon = Aktivität) wird definiert als eine „erworbene spezifische Änderung der Reaktionsfähigkeit des Immunsystems gegenüber körperfremden, eigentlich unschädlichen und zuvor tolerierten Substanzen, die als Allergen erkannt werden“ (Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 2010).

1.1.1 Allergietypen

Coombs und Gell teilten die immunologischen Überempfindlichkeitsreaktionen 1963 in vier Allergietypen ein: Sofort-Typ, zytotoxischer Typ, Immunkomplex-Typ und Spät-Typ (vgl. Tab. 1). Alle vier Formen sind nicht isoliert zu betrachten, sondern gehen zum Teil ineinander über oder laufen parallel. Der häufigste Typ ist die Sofortreaktion, unter die auch die hier behandelte respiratorische Allergie gegen Birkenpollen fällt (Coombs and Gell, 1963).

Tab. 1: Allergietypen nach Coombs und Gell (Bühling et al., 2008)

	Typ I Sofort-Typ	Typ II Zytotoxischer Typ	Typ III Immun- Komplex-Typ	Typ IV Spät-Typ
Ursache	z.B. Medikamente, Pollen, Nahrungsmittel	z.B. Medikamente	z.B. Pilzsporen, Tierproteine, Medikamente	z.B. Nickel, Duftstoffe, Medikamente (Kontakt- allergene), Transplanta- tionsgewebe
Mechanismus	IgE- vermittelte Mastzell- degranulation	Zytolyse durch Komplementak- tivierung nach Bindung von Antikörpern (IgG, IgM) an membranstän- dige Allergene	Komplement- Aktivierung durch gewebsständige oder zirkulierende Antigen- Antikörper- Komplexe (IgG, IgM, IgA)	Aktivierung von T- Lymphozyten
Klinisches Bild	Asthma, Rhinitis, Rhinokon- junktivitis, Urtikaria, Angioödem, anaphylak- tischer Schock	Transfusions- reaktion, Anämie, Thrombopenie, Agranulozytose	Serumkrankheit, allerg. Vaskulitis, exogen-allerg. Alveolitis, allerg. bronchopulmo- nale Aspergillose	allg. Kontakt- ekzem, Arzneimittel- exanthem, Transplantat- abstoßung
Reaktionszeit	s-min	6-12 h	6-12 h	12-72 h

Die drei ersten Typen sind Frühreaktionen und werden vor allem durch humorale Faktoren unterhalten. Überwiegend zellulär vermittelt ist hingegen die Spätreaktion des Typ IV.

1.1.2 Allergische Immunantwort des Typ-I-Allergikers

Bestimmte Menschen haben eine hereditäre Prädisposition zur Entwicklung von Sofort-Typ-Allergien gegen gewöhnliche, eigentlich harmlose Umweltallergene, die als Atopie bezeichnet wird. Zusätzlich zu der genetischen Komponente werden u.a. die verbesserte Hygiene in den Industrieländern und eine damit verbundene reduzierte Infektionszahl sowie eine Veränderung der kommensalen Mikroflora im Intestinaltrakt

mit ungenügender Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren, die als Teil der angeborenen Abwehr nach Kontakt mit Krankheitserregerantigenen über eine Signalkaskade zur Stimulation der protektiven Immunabwehr führen, als Hauptursachen für eine allergische Fehlsteuerung angenommen (Prioult and Nagler-Anderson, 2005).

Zu den Sofortallergien werden allergische Rhinokonjunktivitis, Asthma, Urtikaria sowie systemische Überempfindlichkeiten gegen Hymenopterengifte, Nahrungsmittel und Arzneistoffe gezählt. Sie zeichnen sich durch die Produktion spezifischer Immunglobulin (Ig) E-Antikörper gegen nicht pathogene Allergene wie Pollen, Hausstaubmilben, Nahrungsmittel, Pilzsporen, Tierhaare sowie Arzneimittel und Insektengift aus. Bei Allergenkontakt kommt es meist innerhalb weniger Minuten zu IgE-vermittelten allergischen Reaktionen (Grevers and Röcken, 2008, S. 28).

1.1.3 Pathophysiologie der Typ-I-Reaktion

Für die Typ-I-Reaktion ist die Bildung spezifischer IgE-Antikörper gegen Umweltallergene kennzeichnend. Nach primärem Kontakt mit dem Allergen kommt es zur Bildung allergenspezifischer T-Helfer (Th) 2-Zellen. Diese induzieren über Interleukin (IL)-4 und IL-13 den Antikörper-Klassenwechsel von IgM (zumeist über IgG) zu spezifischen Antikörpern der IgE-Klasse (Del Prete et al., 1993; Lundgren et al., 1989). Dieser Vorgang wird als Sensibilisierung bezeichnet. Die IgE-Antikörper binden anschließend an hochaffine IgE-Rezeptoren (FcεR) auf der Oberfläche von Effektorzellen, wie Mastzellen oder basophile Granulozyten.

Bei Zweitkontakt mit dem entsprechenden Antigen wird die Effektorphase eingeleitet. Über die Vernetzung zweier auf der Oberfläche gebundener IgE-Moleküle durch das Antigen wird die Degranulation der Effektorzelle ausgelöst und proinflammatorische Mediatoren werden freigesetzt. Es werden Histamin, Serotonin, Heparin, plättchenaktivierender Faktor (PAF), SRS-A (*slow reacting substance of anaphylaxis*, Leukotriene C4, D4, und E4) sowie Prostaglandine ausgeschüttet (Kinet, 1999; Macfarlane et al., 2000). Zu den Zielstrukturen der freigesetzten Mediatoren gehören Nerven, Gefäße und glatte Muskelzellen. Dort werden die typischen allergischen Symptome wie Juckreiz, Ödem, Urtikaria, Bronchokonstriktion, gastrointestinale Beschwerden und Hypotonie ausgelöst. Wesentliche Effektorzellen hierbei sind Mastzellen, die vorzugsweise dort lokalisiert sind, wo besonders häufig Kontakt mit den aus der natürlichen Umwelt aufgenommenen Allergenen besteht (Atemwege, Haut, Darm).

Im Verlauf der allergischen Immunreaktion werden mit Hilfe von Chemokinen T-Lymphozyten an den Ort der Allergenexposition rekrutiert. Die von ihnen freigesetzten Zytokine können zusätzliche allergische Beschwerden in Form einer Spätphase-Reaktion auslösen (Macfarlane et al., 2000).

1.2 Epidemiologie der Typ-I-Allergie

Die Inzidenz atopischer Erkrankungen wie allergische Rhinitis, allergisches Asthma und atopische Dermatitis hat in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen. In epidemiologischen Studien wird die Rate der in den westlichen Industrieländern an Asthma bronchiale bzw. an allergischer Rhinitis Erkrankten mit 8% bzw. 20% angegeben (Bauchau and Durham, 2004; Beasley et al., 2000; Bousquet and Khaltaev, 2007; Sly, 1999). Auch in den Entwicklungsländern scheinen allergische Erkrankungen bedingt durch sozioökonomische Veränderungen vermehrt aufzutreten (Platts-Mills and Cooper, 2010).

Unter den Allergieauslösern haben Pollen eine besondere klinische Relevanz. Diese zeigt sich auch in einem Anstieg der Prävalenz der Pollenallergie von bis zu 40% innerhalb der letzten Jahrzehnte (D'Amato et al., 2007). Einer der Hauptproduzenten von Baumpollen ist die Birke (*Betula* spp.). Die Birkenpollenallergie ist daher eine der am meisten verbreiteten Allergien in Europa. In einigen Regionen zeigen 54% der Bevölkerung einen positiven Hautpricktest (allergische Hautreaktion nach Einbringen von Birkenpollenextrakt in die oberste Hautschicht) auf Birkenpollen (D'Amato et al., 2007; Eriksson and Holmen, 1996). Unter den Birkenpollen-Bestandteilen ist Bet v 1 ein Major-Allergen, d.h. eine Allergenkomponente, mit der mehr als 50% der gegen das gesamte Allergen sensibilisierten Allergiker reagiert (Jarolim et al., 1989; Niederberger et al., 1998). So konnte am Beispiel der Birkenpollenallergiker gezeigt werden, dass über 95% gegen Bet v 1 sensibilisiert sind (Jarolim et al., 1989; Movérare et al., 2002).

1.3 Immunsystem

1.3.1 T-Lymphozyten im Kontext der Typ-I-Allergie

T-Lymphozyten sind eine wesentliche zelluläre Komponente der spezifischen Immunantwort. Zu ihrer Zellpopulation zählen die Th-Zellen und die regulatorischen T (Treg)-Zellen, welche im Folgenden kurz beschrieben werden.

1.3.1.1 T-Helfer-Zellen

Th-Zellen sind durch die Oberflächenexpression von CD (*cluster of differentiation*) 4 gekennzeichnet. Ihre Entwicklung findet im Thymus statt. Nach Antigenpräsentation durch dendritische Zellen (DC, *dendritic cell*) wird die Th0-Zelle zur Proliferation und Differenzierung in eine der Th-Zell-Subpopulationen stimuliert (Koolman and Röhm, 2003, S. 294f; Muraille and Leo, 1998). Diese Differenzierung erfolgt entsprechend den im Umgebungsmilieu vorherrschenden Zytokinen. IL-12, IL-18 und IL-27 induzieren beispielsweise die Bildung von Th1-Zellen und IL-4 bewirkt die Th2-Zell-Bildung (Akdis and Akdis, 2009).

Th1-Zellen sind an der zellulären Immunität gegenüber Pathogenen wie Viren und Bakterien beteiligt. Sie fungieren als Regulatorzellen in Entzündungsreaktionen (Spät-Typ-Reaktion, vgl. Tab. 1) und stehen im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen und Transplantatabstoßungen (Hoft et al., 2000; Romagnani, 2006). Th1-Zellen produzieren die Zytokine IL-2, Interferon (IFN) γ , Tumornekrosefaktor (TNF)- α und TNF- β .

Th2-Zellen beeinflussen über die Zytokine IL-4 und IL-5 B-Zellen in ihrer Funktion. IL-4 fördert die B-Zellaktivierung und den Isotypenwechsel zu allergenspezifischen IgE- und IgG4-Antikörpern. IL-5 unterstützt die Reifung dieser Zellen zu antigenproduzierenden Plasmazellen. Th2-Zellen sind dadurch an der humoralen Abwehr beteiligt und sind Gegenspieler der Treg-Zellen bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung allergischer Erkrankungen (Larché et al., 2006; Ozdemir et al., 2009; Romagnani, 2006).

1.3.1.2 Regulatorische T-Zellen

Treg-Zellen wurden erstmals 1995 von Sakaguchi et al. beschrieben und stellen eine weitere Untergruppe der CD4⁺ T-Zellen dar (Sakaguchi et al., 1995). Sie sind für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase zuständig und haben dazu vielfältige Effektorfunktionen. Sie supprimieren u.a. die Funktion der Effektor-T (Teff)-Zellen und schränken damit die Immunantwort ein. Im Zuge der Immunabwehr sind Treg-Zellen für die periphere Toleranzentwicklung und die spezifische Immunsuppression verantwortlich (Taylor et al., 2006). Sie hemmen antigenpräsentierende Zellen, die Proliferation allergenspezifischer Th-Zellen und die Zytokinsekretion der Th1- und Th2-Zellen. Treg-Zellen sind bei allergischen und bei nicht-allergischen Individuen vorhanden. Jedoch scheint ihre supprimierende Eigenschaft bei Allergikern verglichen mit Nicht-Allergikern vermindert (Bellinghausen et al., 2005; Ling et al., 2004). Auch in Bezug auf Birkenpollenallergien lässt sich eine verminderte Unterdrückung der Teff-Zell-Proliferation nach Stimulation mit Birkenpollenallergen (BPA) belegen (Thunberg et al., 2007).

Unter den Subpopulationen der Treg-Zellen sind besonders Typ-I-regulatorische T-Zellen (Tr1) im Rahmen dieser Arbeit relevant, da sie sich durch eine besonders hohe IL-10 Sekretion auszeichnen (Roncarolo et al., 2006). Bei Tr1-Zellen findet die Differenzierung und Induktion außerhalb des Thymus in der Peripherie durch Antigenstimulation statt (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009). Sie sind Foxp3⁻, CD4⁺, CD25⁺ und wirken immunmodulatorisch (Roncarolo et al., 2006). Tr1-Zellen üben ihren immunsuppressiven Effekt, neben IL-10, über das Zytokin TGF-β (*transforming growth factor*-β) und mit Hilfe verschiedener Oberflächenmoleküle wie *cytotoxic T lymphocyte antigen* (CTLA)-4 und *programmed death 1* (PD-1) aus (Letterio and Roberts, 1998; Taylor et al., 2006).

Eine Übersicht der supprimierenden und induzierenden Funktionen der Treg-Zellen im Kontext einer allergischen Immunantwort ist in Abb. 1 dargestellt.

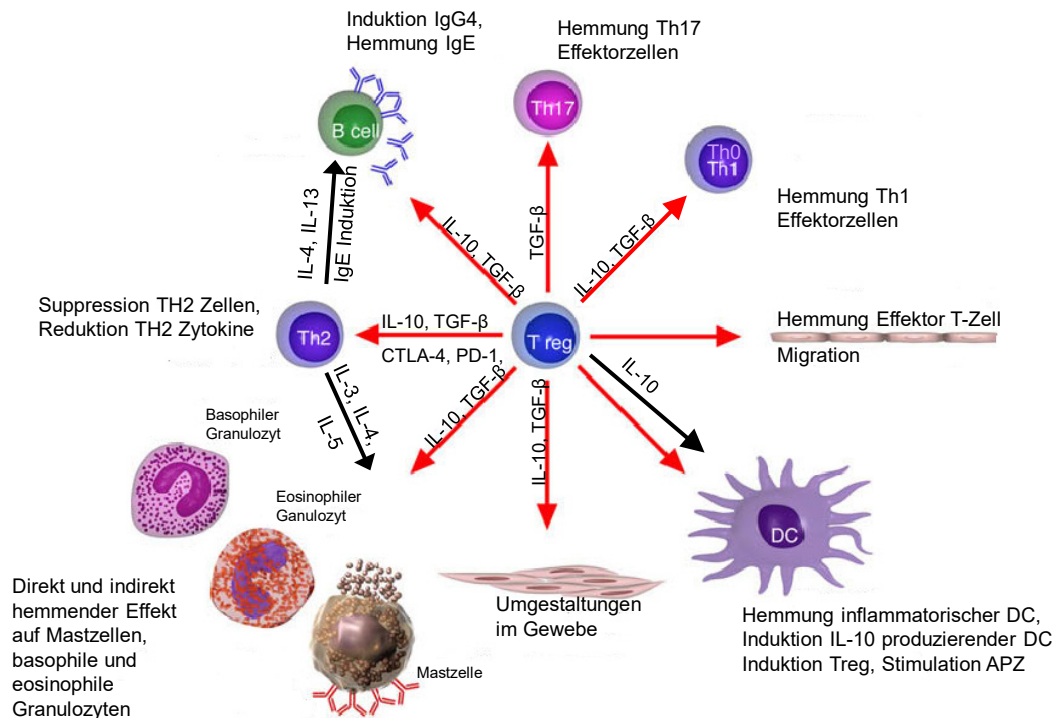


Abb. 1: Regulatorische T- Zellen in der allergischen Immunantwort

Regulatorische T (Treg)-Zellen sind auf vielfältige Art und Weise an der Kontrolle der allergen-induzierten Immunantwort beteiligt. Sie nutzen die Suppressorfaktoren Interleukin (IL)-10, *transforming growth factor* (TGF)- β , *cytotoxic T lymphocyte antigen* (CTLA)-4 und *programmed death* (PD)-1, um in die Reaktionen auf allergische Entzündungen (Suppression der T-Helfer (Th) 2-Zellen und Reduktion der Th2-Zytokine) einzugreifen. TGF- β und IL-10 unterdrücken die Th0/Th1 Zellinduktion. Sie wirken damit der Einleitung gewebsschädigender Mechanismen (Apoptose der Keratinozyten und der bronchialen Epithelzellen) entgegen. Rote Pfeile stehen für Suppression, schwarze Pfeile bedeuten Induktion. APZ = antigenpräsentierende Zellen, DC = dendritische Zellen (Modifiziert nach Akdis and Akdis, 2009).

1.3.2 Zytokine im Kontext der Typ-I-Allergie

Zytokine regulieren die Intensität und Dauer einer Immunantwort. Sie hemmen oder stimulieren dafür Aktivierung, Proliferation und/oder Differenzierung ihrer Zielzellen und steuern die Sekretion von Antikörpern oder anderen Zytokinen. Sie sind Polypeptide, die als Mediatoren wirken. Ihre Gruppe schließt IL, TGF und IFN mit ein, deren Aufgabe in der Vermittlung von Zellinteraktionen besteht. Dafür binden sie an spezifische Rezeptoren auf der Zellmembran der Zielzelle. Sie können dabei parakrin (Aktivierung von Zellen in unmittelbarer Nähe der produzierenden Zelle) oder autokrin (produzierende Zelle entspricht der Zielzelle) wirken. Wenn sie über den Blutkreislauf zur Zielzelle gelangen, wird dies als endokrine Wirkung bezeichnet (Grevers and

Röcken, 2008, S. 20f; Hahn et al., 2008, S. 80ff). Tab. 2 gibt eine Übersicht über die wichtigsten Zytokine im Rahmen einer allergischen Immunantwort.

Tab. 2: Übersicht der Zytokine (Modifiziert nach Hahn et al., 2008, S. 81)

Bezeichnung	Wichtige Funktion	Wichtiger Produzent	Wichtige Zielzelle
IL-2	T-Zellstimulation	T-Zellen	T-Zellen
IL-4	B-Zellaktivierung	Th2-Zellen	B-Zellen
	Basophilenanlockung	Mastzellen, natürliche Killer (NK)-T-Zellen, Th2-Zellen	Basophile
	Klassenwechsel zu IgE	Th2-Zellen	B-Zellen
IL-5	B-Zellreifung	Th2-Zellen, Mastzellen	B-Zellen
	Eosinophilenaktivierung		Eosinophile
IL-10	Immuninhibition, hemmt Aktivierung von Th1-/ Th2-Zellen und Makrophagen	Th2-Zellen, Treg-Zellen, Makrophagen	Makrophagen, T-Zellen
IL-12	Aktivierung von Th1-Zellen und zytotoxischen T-Zellen	Makrophagen, dendritische Zellen	T-Zellen
IL-17	Entzündung	Th17-Zellen	Neutrophile
IFN γ	Makrophagenaktivierung, hemmt Th2-Zellen, Klassenwechsel zu IgG	T-Zellen, insb. Th1-Zellen, NK-Zellen	Makrophagen, B-Zellen
TGF- β	Immuninhibition	Th-Zellen, Treg-Zellen, Makrophagen	T-Zellen, Makrophagen
	Klassenwechsel zu IgA		B-Zellen
	Wundheilung		Epithelzellen

Im folgendem werden die im Zusammenhang mit der vorliegenden Studie relevanten Zytokine ausführlicher beschrieben.

IL-5

IL-5, ein typisches Th2-Zellprodukt, das aber auch von Mastzellen sezerniert wird, ist entscheidend an der Th-2-vermittelten allergischen Reaktion beteiligt (Romagnani, 2000). Dazu wirkt es aktivierend auf Eosinophile und trägt maßgeblich zu ihrer Rekrutierung und Differenzierung bei. Eine allergeninduzierte Kreuzvernetzung der IgE-Rezeptoren leitet zusammen mit IL-5 die Degranulation der Eosinophilen ein. Die dabei ausgeschütteten granulären Inhaltsstoffe können zu Gewebsschädigungen führen. Zusätzlich ist IL-5 an der Entwicklung von mukosalen Entzündungen in Zusammenhang mit Asthma bronchiale und allergischer Rhinitis beteiligt (Durham et al., 1992). Außerdem unterstützt es die B-Zellentwicklung zur Plasmazelle und ist zuständig für die Stimulation zytotoxischer Eigenschaften gegen Parasiten (Hahn et al., 2008, S. 82ff).

IFN γ

IFN γ ist ein typisches Produkt der Th1-Zellen und wird auch von zytotoxischen T-Zellen und natürlichen Killer (NK)-Zellen gebildet. Die IL-4-Genexpression und damit verbunden auch die IgE-Bildung werden durch IFN γ unterdrückt (Elser et al., 2002). Es hemmt zusätzlich die Entwicklung und Rekrutierung von Th2-Zellen und beeinflusst die Entwicklung naiver Th0-Zellen zu einem Th1-Phänotyp. Des Weiteren fördert es in B-Lymphozyten den Klassenwechsel der Antikörper von IgM zu IgG und trägt damit zur Verbesserung der humoralen Immunität bei. Zusätzlich unterstützt IFN γ die Aktivität der NK-Zellen und induziert die Apoptose in T-Zellen und Eosinophilen (Luttmann et al., 2000; Refaeli et al., 2002). Durch diese Mechanismen kann die Freisetzung von entzündlichen Th2-Mediatoren reduziert und die klinische Symptomatik einer Allergenexposition wie bronchiale Hyperreaktivität und bronchoalveoläre Eosinophilie vermindert werden (Huang et al., 2001; Teixeira et al., 2005).

Durch die Induktion von T-Zell-Anergie und vermehrte Apoptose der IL4⁺ T-Zellen scheint IFN γ eine potentiell protektive Wirkung auf unphysiologische Th2-Antworten zu besitzen (Gardner et al., 2004). Als T-Zell-Anergie wird dabei ein Toleranzmechanismus bezeichnet, der mit einer Verringerung der antigenspezifischen T-Zellantwort einhergeht (Schwartz, 2003).

IFN γ ist zudem der wichtigste makrophagenaktivierende Faktor (MAF). Es fördert in Makrophagen die Fähigkeiten der Tumorzellzerstörung und der Abtötung von intrazellulären Erregern. Schließlich induziert IFN γ in verschiedenen Zellen die Expression von Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex; MHC) Klasse II-Molekülen und ist entscheidend an der Phagozytenantwort beteiligt (Hahn et al., 2008, S. 85).

IL-10

Eine bedeutende Quelle für IL-10 stellt die Gruppe der Treg-Zellen dar. Dabei zeichnen sich besonders Tr1-Zellen durch eine hohe Expression dieses Zytokins aus (Möbs et al., 2010). IL-10 wird, allerdings in geringerem Maße, auch von Th0-Zellen, Th2-Zellen, B-Zellen und Makrophagen gebildet (Moore et al., 2001). Es besitzt hauptsächlich immunsuppressive Wirkung. IL-10 wird für die Senkung der Expression bestimmter allergiefördernder Zytokine, wie IL-4, IL-5 und IL-13 (Jutel et al., 2003), und für die Induktion allergenspezifischer T-Zell-Anergie verantwortlich gemacht (Groux et al., 1996). IL-10 ist damit entscheidend an der peripheren Toleranzentwicklung beteiligt (O'Garra et al., 2008). Diese zentrale Rolle zeigt sich auch in einer Studie von Enk et al., in der Mäusen vor der Behandlung IL-10 appliziert wurde, was eine Unempfindlichkeit der T-Zellen für spezifische Antigene auslöste (Enk et al., 1994). Auf B-Zellen hat IL-10 zwei Haupteffekte. Zum einen vermindert es die ϵ -Transkript Expression, wodurch die Produktion von IgE reduziert wird, zum anderen induziert IL-10 die $\gamma 4$ -Transkript Expression und erhöht damit die IgG4-Produktion (Akdis et al., 1998; Jeannin et al., 1998; Satoguina et al., 2005). Zusammen mit der unterdrückenden Wirkung auf die Th-Zellproliferation übt IL-10 damit seine immunsupprimierende Aktivität sowohl auf zellulärer als auch auf humoraler Ebene aus. IL-10 hemmt zudem die IL-12-Produktion und damit indirekt die IL-12-vermittelte IFN γ -Entwicklung (Akdis and Akdis, 2009).

Neben der modulierenden Wirkung auf die Funktion der Eosinophilen hat IL-10 auch einen immunsuppressiven Effekt auf antigenpräsentierende Zellen. Für Monozyten und DC wurde gezeigt, dass IL-10 kostimulierende Moleküle hemmt, die Expression von MHC Klasse II-Molekülen unterdrückt und die Reifung und Fähigkeit zur Antigenpräsentation reduziert (De Smedt et al., 1997; Schandené et al., 1994). Damit wird indirekt die T-Zellproliferation inhibiert. Die Beeinflussung der Makrophagen durch IL-10 erfolgt primär autokrin als negative *feedback* Regulation (de Waal Malefyt et al., 1991; Moore et al., 2001). Durch diesen Einfluss auf antigenpräsentierende Zellen kann IL-10 einer überschießenden Entzündungsreaktion entgegenwirken.

TGF- β

Die TGF- β Superfamilie besteht aus über 35 Mitgliedern, wovon TGF- β_1 , TGF- β_2 und TGF- β_3 in Säugetieren vorkommen (Akdis and Akdis, 2009). In der vorliegenden Arbeit wird der Übersichtlichkeit wegen TGF- β_1 nachfolgend verkürzt als TGF- β bezeichnet.

TGF- β ist ein für die Immunregulation bedeutendes Zytokin und wesentlich für die Aufrechterhaltung der immunologischen Selbsttoleranz im Bereich der CD4⁺ T-Zellen. Genau wie IL-10 hat es vorwiegend immuninhibitorische Wirkung und ist hauptsächlich bei der Entwicklung der mukosalen Toleranz von Bedeutung (Meiler et al., 2008). TGF- β wird von antigenstimulierten T-Zellen, Makrophagen und insbesondere von Treg-Zellen gebildet (Roncarolo et al., 2006). Eine TGF- β Expression durch CD4⁺ T-Zellen kann auch über CTLA-4 Signale induziert werden (Chen et al., 1998). Eine Blockade dieser Signale führte im Maus-Modell zum Anstieg der allergischen Entzündung, was auch mit einem Abfall des TGF- β Niveaus in der bronchoalveolären Lavage einherging (Hellings et al., 2002).

TGF- β hemmt die T-Zellproliferation und die Makrophagenaktivierung. Des Weiteren induziert es den Antikörperklassenwechsel zu IgA und hat u.a. durch seine chemotaktische Wirkung Bedeutung in der Wundheilung (Cazac and Roes, 2000). Zusätzlich supprimiert TGF- β Th1- und Th2-fördernde Transkriptionsfaktoren (Gorelik et al., 2000; Gorelik et al., 2002) und hemmt die mukosale allergenspezifische T-Zellaktivierung (Akdis et al., 2004; Mothes et al., 2003). Außerdem kann TGF- β gemeinsam mit IL-2 naive T-Zellen durch Antigenstimulation in Foxp3⁺ Treg-Zellen umwandeln (Chen et al., 2003; Kunzmann et al., 2003).

1.4 Therapieformen bei allergischen Erkrankungen

Die Therapie der IgE-vermittelten Sofortallergie bietet eine Vielzahl von Behandlungsansätzen (vgl. Abb. 2). In der Praxis bewährt haben sich neben der Allergenkenz die rein symptomatische Therapie mit Medikamenten und die SIT.

Allergenkenz bedeutet die strikte Vermeidung der relevanten Allergene. Sie ist beispielsweise bei Nahrungsmittelallergien oder Tierhaarallergien durchführbar. Bei dem größten Teil der Allergene ist eine Kenz jedoch nur bedingt möglich.

Zur medikamentösen Behandlung der allergischen Symptome stehen Antihistaminika, Kortikosteroide (Mineralokortikoide und Glukokortikoide) und Cromone (Mastzellinhibitoren) zur Verfügung. Bei asthmatischen Symptomen finden β_2 -Adrenorezeptor-Agonisten Anwendung (Brožek et al., 2017; Douglass and O'Hehir, 2006).

Die SIT stellt die einzige kausale medikamentöse Behandlungsmethode allergischer Erkrankungen dar. Dabei wird das Immunsystem in repetitiven Applikationen einer initial zunehmenden Allergendosis ausgesetzt. Dies führt zu einer Aktivierung von toleranzinduzierenden T-Zellen, spezifischen blockierenden Antikörpern und Botenstoffen, welche eine weitere Verstärkung der durch Allergene ausgelösten Immunantwort blockieren, die allergenspezifische Immunantwort hemmen und die lokale Entzündungsreaktion reduzieren. Ziel der SIT ist eine Immuntoleranz gegenüber dem Allergen.

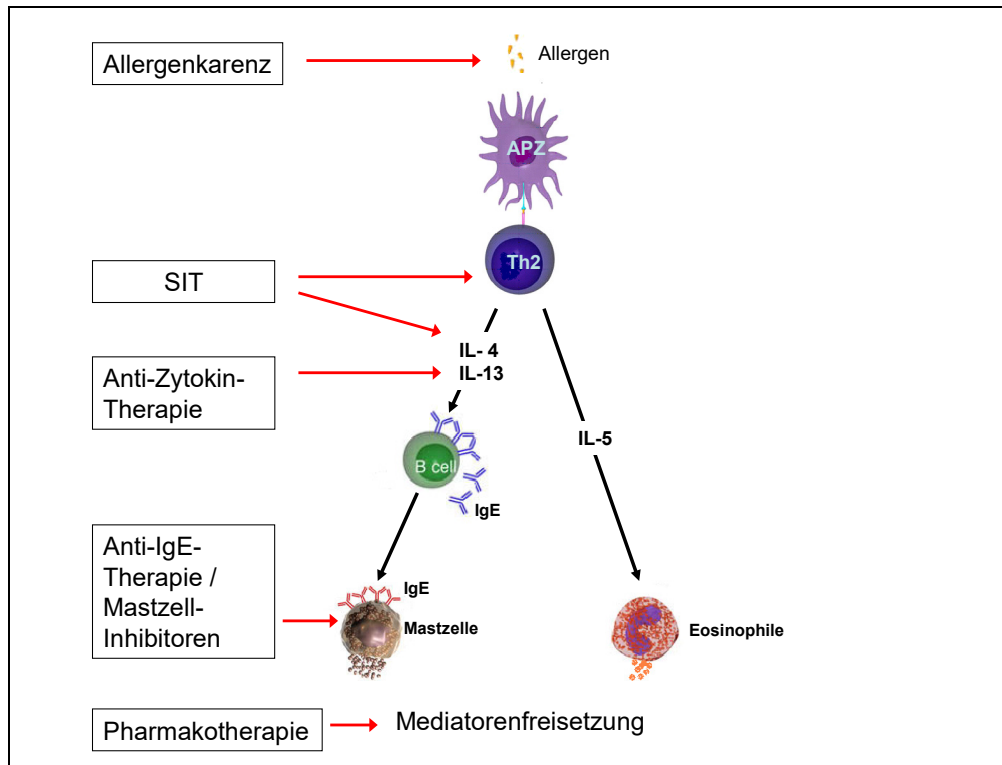


Abb. 2: Therapieformen bei allergischen Erkrankungen vom Sofort-Typ

Kausale Therapiemaßnahmen zur Behandlung eines Typ-I-Allergikers sind die Allergenkarenz und die spezifische Immuntherapie (SIT). Bei der Anti-Zytokin-Therapie werden mit dem Ziel, das T-Helfer (Th) 2-Th1-Gleichgewicht wiederherzustellen, wahlweise Th2-Zytokine durch Zytokinantagonisten supprimiert oder durch den Einsatz von Interleukin (IL)-12 und Interferon (IFN) γ eine Th1-Immunantwort gefördert. Anti-IgE-Antikörper binden freies Serum IgE und inhibieren damit die Initiierung der allergischen Effektorantwort durch IgE-Bindung an Rezeptoren auf der Oberfläche von Basophilen, Eosinophilen und Mastzellen. Symptomatisch wirkende Mastzellinhibitoren hemmen den Kalziumeinstrom in die Zelle und verhindern den Austritt der Allergiemediatoren aus der Zelle. Die Mediatoren können nicht mehr im Gewebe wirksam werden, wodurch die Symptome einer IgE-vermittelten allergischen Reaktion reduziert werden. Die ebenfalls symptomatisch wirkende Pharmakotherapie vermindert die Zytokinfreisetzung (z.B. Glukokortikoide) und hemmt die Mediatoren der Entzündungszellen (z.B. Antihistaminika oder Leukotrienantagonisten). Rote Pfeile stehen für Suppression, schwarze Pfeile bedeuten Induktion. APZ = antigenpräsentierende Zelle (modifiziert nach Douglass und O'Hehir, 2006).

1.4.1 Spezifische Immuntherapie

Die Wirksamkeit der SIT wurde in zahlreichen randomisierten, doppelt verblindeten und placebokontrollierten Studien (Bødtger et al., 2002; Grammer et al., 1982; Jutel et al., 2005; Walker et al., 1995) sowie zusammenfassend in Metaanalysen (Calderon et al., 2011; Calderon et al., 2010; Dretzke et al., 2013) nachgewiesen.

Neben dem kausalen Effekt hat die SIT auch eine präventive Wirkung. Derzeit ist sie die einzige Therapieform, die das Risiko der Entwicklung eines Asthma bronchiale („Etagenwechsel“) bei Patienten mit allergischer Rhinitis senkt. Daten aus der europäischen multizentrischen *Preventive-Allergy-Treatment*-(PAT)-Studie konnten

einen signifikanten Rückgang der Ausbildung eines Asthma bronchiale belegen. Hierbei wurden insgesamt 205 Kinder mit allergischer Rhinitis, welche entweder mit einer SIT oder rein medikamentös therapiert wurden, über zehn Jahre lang nachbeobachtet (Jacobsen et al., 2007). Ebenfalls wird durch die SIT das Risiko von Neusensibilisierungen erheblich gesenkt. Dies konnte in einer prospektiven Studie mit Hausstaubmilbenallergikern (3-jährige SIT) und in einer retrospektiven Studie an monosensibilisierten Allergikern mit 7-jähriger Beobachtungszeit gezeigt werden (Des Roches et al., 1997; Purello-D'Ambrosio et al., 2001). Die ökonomischen Vorteile einer SIT sind ein reduzierter Medikamentenverbrauch und die Steigerung der Leistungsfähigkeit bzw. die Verringerung von Fehlzeiten am Arbeitsplatz (Greiner et al., 2003).

Eine Modifikation der SIT ist die Verabreichung des Allergens in Verbindung mit Adjuvantien. Diese sollen die klinische und immunologische Wirksamkeit der Immuntherapie verstärken. Immunmodulatorisch wirksam sind dabei z.B. Monophosphoryllipid A oder CpG-Oligonukleotidmotive (Mo et al., 2006; Rosewich et al., 2010).

Die Differenzierung der SIT-Behandlungen erfolgt u.a. nach der Applikationsform des verabreichten Allergens. So werden subkutane Immuntherapie (SCIT) und sublinguale Immuntherapie (SLIT) voneinander unterschieden.

1.4.1.1 Subkutane Immuntherapie

Das Prinzip der SCIT besteht in der wiederholten subkutanen Injektion des relevanten Allergens. Begonnen wird mit einer initialen Allergenverabreichung in ansteigender Dosierung (Einleitungsphase). In der folgenden Phase (Erhaltungsphase) wird die Dosis der letzten initialen Applikation beibehalten und die Therapie meist über einen Zeitraum von drei Jahren fortgeführt (Alvarez-Cuesta et al., 2006; Mailing and Weeke, 1993). Sie kann präseasonal als Kurzzeittherapie oder perennial zur Anwendung kommen (Bousquet et al., 1998; Calderon et al., 2007). Für eine wirksame Immuntherapie muss eine Dosis entsprechend dem WHO-Positionspapier von 1998 zwischen 5 und 20 µg Major-Allergen je Injektion appliziert werden (Bousquet et al., 1998).

1.4.1.2 Sublinguale Immuntherapie

Die Allergenextrakte zur SLIT werden als wässrige Lösung oder Tabletten angewandt und über die Schleimhäute der Mundhöhle aufgenommen. Dabei besteht die Möglichkeit sehr hohe Dosen zu applizieren, ohne dass es zu systemischen Reaktionen kommt. Lokale Reaktionen im Mund- und Rachenraum können jedoch auftreten. Beispielsweise werden orale Schleimhautsymptome von 75% der Patienten angegeben, wobei diese meist selbstlimitierend und nicht therapiebedürftig sind (Cox et al., 2006). Nach der aktuellen evidenzbasierten Leitlinie ist die Wirksamkeit der SLIT bei allergischer Rhinokonjunktivitis durch Gräserpollen bei Erwachsenen und Kindern sehr gut und bei Baumpollenallergie bei Erwachsenen gut belegt (Pfaar et al., 2014).

1.4.2 Präparate für die spezifische Immuntherapie

Die verabreichten Präparate beinhalten Allergene, welche zur Durchführung der Immuntherapie in wässriger Lösung aufgelöst oder an eine Depotträgersubstanz gekoppelt werden (Pfaar et al., 2014). Depotträger, wie Aluminiumhydroxid, Tyrosin, Alginat oder Kalziumphosphat, sollen eine hohe systemische Allergenkonzentration direkt nach der Applikation und die damit verbundene erhöhte Gefahr einer anaphylaktischen Reaktion vermindern (Heydenreich et al., 2014; Møllerup et al., 2000).

Bei der SIT der vorliegenden Studie wurden ALK-depot SQ-Präparate verwendet. Diese enthalten gereinigte Allergene in natürlicher Form gebunden an Aluminiumhydroxid. Die Adsorption an Aluminiumhydroxid bewirkt den erwähnten Depoteffekt im Sinne einer verzögerten Resorption der Allergene (<http://alk-abello.com>, 15.04.2016).

In der labormedizinischen Untersuchung wurde zur Stimulation der PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) rekombinantes (r)Bet v 1 (Biomay, Wien, Österreich) verwendet. rBet v 1 ist ein 17-kDa großes zytoplasmatisches Protein, das viele gemeinsame IgE-Epitope mit Baumpollen der Ordnung *Fagales* (Birke, Eiche, Haselnuss, Hainbuche, Erle) und mit Bestandteilen pflanzlicher Nahrung (Äpfel, Birnen, Aprikosen, Kirschen) aufweist. rBet v 1 kann natürliche Baumpollenextrakte sowohl in der Diagnostik als auch eventuell standardmäßig zukünftig in der Immuntherapie am Patienten ersetzen (Niederberger et al., 1998; Valenta and Niederberger, 2007).

1.5 Ziel der Studie

Ziel der Studie war, die SIT-induzierten immunologischen Mechanismen im peripheren Blut anhand von Veränderungen auf Zytokinebene zu charakterisieren. Untersucht wurde der Einfluss der SIT auf die Immunantwort bei elf Birkenpollenallergikern über den Verlauf einer dreijährigen Therapie mit Birkenpollenextrakt. Es wurde ein longitudinales Studienprotokoll gewählt, das einen Vergleich der Zytokinproduktion sowohl zu bestimmten Abschnitten der SIT (Einleitungs- und Erhaltungsphase) als auch innerhalb und außerhalb der Birkenpollensaison ermöglichte. Die quantitative Messung der Zytokinmenge erfolgte mittels enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (*enzyme-linked immunosorbent assay*; ELISA). Stellvertretend für die ablaufenden Immunvorgänge und im Konsens mit themenverwandten Studien (Eifan et al., 2010; Jutel et al., 2003) wurde in dieser Studie die allergenspezifische Expression der Zytokine IL-5, IFN γ , IL-10, und TGF- β untersucht. Aus den Blutproben von SIT-behandelten Patienten wurden zu engmaschigen Kontrollzeitpunkten PBMC isoliert und diese mit Birkenpollenallergen (rBet v 1) zur Zytokinproduktion angeregt. Gleichzeitig wurden Vergleichsproben von Allergikern und gesunden Nicht-Allergikern ausgewertet. Dieses Studiendesign ermöglichte die Abgrenzung SIT-induzierter Veränderungen von immunologischen Modifikationen unter dem Einfluss natürlicher saisonaler Pollenexposition.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten zudem mit bereits zuvor erhobenen Befunden über die quantitativen Änderungen unterschiedlicher T-Zellpopulationen unter SIT verglichen werden (Möbs et al., 2010; Möbs et al., 2012).

Zusammenfassend sollten mit Hilfe dieser Studie weitere Einblicke in die immunologischen Mechanismen der Entwicklung einer Allergentoleranz gegeben werden. Diese könnten auch als Ansatzpunkte zukünftiger, optimierter Therapieformen der Sofort-Typ-Allergie dienen.

2 Material

2.1 Probenmaterial

Vollblut

Patienten der
Universitätsklinik für
Dermatologie und
Allergologie Marburg

2.2 Lösungen und Zusätze für die Kultivierung humaner Zellen

Fötale Kälberserum (FCS)

PAA, Cölbe

gepooltes humanes Serum (PHS), Typ AB

PAA, Cölbe

L-Glutamin 200mM mit Penicillin-Streptomycin

PAA, Cölbe

10000U/ml-10000µg/ml (PSG)

RPMI 1640 Medium, ohne L-Glutamin

Lonza, Vervies, Belgien

2.3 Kulturmedien

RPMI⁺⁺

RPMI 1640

+ 100 U/ml Penicillin

+ 100 µg/ml Streptomycin

+ 2mM L-Glutamin

RPMI⁺⁺ + 10% PHS

RPMI 1640

+ 100 U/ml Penicillin

+ 100 µg/ml Streptomycin

+ 2mM L-Glutamin

10% PHS

2.4 Chemikalien

Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt
Dulbecco's PBS 1x (w/o $\text{Ca}^{2++}\text{Mg}^{2+}$)	PAA, Cölbe
Salzsäure (HCl)	Fisher Scientific, Loughborough, Leicestershire, UK
Trypanblau-Lösung (0,4%)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Tween 20	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Substratlösung (Tetramethylbenzidin- Dihydrochlorid/Wasserstoffperoxid)	MBL, Naka-ku, Nagoya, Japan
Stopplösung (1N Schwefelsäure)	MBL, Naka-ku, Nagoya, Japan

2.5 Proteinantigene

rekombinantes Bet v 1	Biomay, Wien, Österreich
-----------------------	--------------------------

2.6 Kommerzielle Tests für die serologische Diagnostik

OptEIA Human IL-5 Elisa Set	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
OptEIA Human IL-10 Elisa Set	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
OptEIA Human IFN γ Elisa Set	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
OptEIA Human TGF- β_1 Elisa Set	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

2.7 Verbrauchsartikel

Combitips [®] 5ml, unsteril	Eppendorf, Hamburg
Deckgläschen für Zählkammer, 20x26mm	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
Reaktionsgefäße 1,5ml	Eppendorf, Hamburg

sterile Einweg-Pipetten 1ml - 50ml
sterile 24-well (Loch)-Platten

Pipettenspitzen
unsterile 96-well (Loch)-Platten

sterile Einfrier-Röhrchen (Cryo's) 2ml
Zentrifugen-Röhrchen 15 und 50ml

Greiner, Frickenhausen
Nunc GmbH & Co KG,
Wiesbaden
Kalensee, Gießen
Nunc GmbH & Co KG,
Wiesbaden
Greiner, Frickenhausen
Greiner, Frickenhausen

2.8 Geräte

Auflicht-Mikroskop Axiostar

CO₂-Inkubator, HERA cell 150

Invertoskop ID03 (inverses Mikroskop)

Kühlzentrifuge Megafuge 1.0

Magnetrührer IKAMAG[®] RET
Mehrkanalpipette Discovery 20-200µl
Multipette[®] plus
Neubauer Zählkammer

Pipetten 10µl, 100µl, 200µl, 250µl, 1000µl
Präzisionswaage 440-49N

Sterilbank, HERAsafe

Tecan Sunrise Platten-Lesegerät (ELISA-Reader)

Vortexmixer IKA[®] Genius 3

Carl Zeiss MicroImaging
GmbH, Göttingen
Heraeus Kendro Laboratory
Products GmbH, Langenselbold
Carl Zeiss MicroImaging
GmbH, Göttingen
Heraeus Kendro Laboratory
Products GmbH, Langenselbold
IKA Labortechnik, Staufen
ABIMED, Langenfeld
Eppendorf, Hamburg
Paul-Marienfeld GmbH & Co
KG, Lauda-Königshofen
Eppendorf, Hamburg
Gottl. Kern & Sohn GmbH,
Balingen-Frommern
Heraeus Kendro Laboratory
Products GmbH, Langenselbold
Tecan Deutschland GmbH,
Crailsheim
IKA Labortechnik, Staufen

2.9 Software

Endnote

Clarivate Analytics, USA

GraphPad Prism

GraphPad Software, USA

Microsoft[®] Excel

Microsoft, USA

Microsoft[®] PowerPoint

Microsoft, USA

Microsoft[®] Word

Microsoft, USA

SPSS[®] 20.0

SPSS inc., USA

XFluor4[™]

Tecan Deutschland GmbH,
Crailsheim

3 Methoden

3.1 Patienten

Zur Untersuchung der spezifischen Immuntherapie mit Birkenpollenallergenextrakt wurden elf Birkenpollenallergiker (sieben Frauen, vier Männer; Durchschnittsalter 47 Jahre; Spannweite 32-61 Jahre) in die Studie eingeschlossen. Als Kontrollpopulationen diente zum einen ein Kollektiv von acht rein symptomatisch therapierten Birkenpollenallergikern (fünf Frauen, drei Männer; Durchschnittsalter 38 Jahre; Spannweite 26-58 Jahre) und zum anderen acht Probanden ohne Ausprägung einer IgE-vermittelten Allergie (fünf Frauen, drei Männer; Durchschnittsalter 33 Jahre; Spannweite 25-49 Jahre).

Jeder Proband gab vor Einschluss in die Studie sein schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an den wissenschaftlichen Untersuchungen.

Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Philipps-Universität Marburg genehmigt.

3.1.1 Einschlusskriterien für die spezifische Immuntherapie

Einschlusskriterien zur Teilnahme an der Studie waren:

- Anamnese einer klinisch relevanten respiratorischen Allergie vom Sofort-Typ gegen Birkenpollen mit mäßiger bis schwerer saisonaler allergischer Rhinokonjunktivitis (RCA) und/oder kontrolliertem Asthma bronchiale
- positiver Nachweis einer IgE-vermittelten Sensibilisierung auf Birkenpollen im Pricktest oder Intrakutantest
- positiver Nachweis spezifischer IgE-Antikörper gegen Birkenpollenextrakt und rekombinantes Bet v 1
- positiver nasaler Provokationstest gegen Birkenpollenextrakt.

3.1.2 Ausschlusskriterien für die spezifische Immuntherapie

Nicht in die Studie aufgenommen wurden minderjährige und nicht einwilligungsfähige Patienten. Weitere Ausschlusskriterien waren Schwangerschaft oder eine bereits erfolgte Hyposensibilisierung auf Birkenpollen. Kontraindikationen, die darüber hinaus gegen die Durchführung einer SIT sprechen, bestanden bei klinisch relevanten

Allergien gegen weitere Pollenallergene, Polysensibilisierungen mit perennierenden Symptomen und bei den in Tab. 3 aufgeführten Gegebenheiten.

Tab. 3: Kontraindikationen der subkutanen spezifischen Immuntherapie (nach Pfaar et al., 2014)

- Teil- oder unkontrolliertes Asthma bronchiale (Einteilung nach neuen GINA-Leitlinien, 2007 bzw. nach NVL)
- Erkrankungen, bei denen die Gabe von Adrenalin kontraindiziert ist (außer bei Insektengiftallergie)
- Behandlung mit β -Blockern (lokal, systemisch)
- Schwere Autoimmunerkrankungen, Immundefekte, Immundefizienz, Immunsuppression
- Maligne neoplastische Erkrankung mit aktuellem Krankheitswert
- Schwerwiegende systemische Reaktionen bei durchgeführter SIT in der Vergangenheit
- Unzureichende Compliance

3.1.3 Studienprotokoll der spezifischen Immuntherapie

Die Studienteilnehmer erhielten über den Zeitraum von 36 Monaten eine SCIT mit BPA-Extrakt. Die Applikation des Allergenpräparates erfolgte in der Allergieambulanz der Klinik für Dermatologie und Allergologie der Philipps-Universität Marburg nach einem standardisierten Dosierungsschema (siehe unten).

Der zeitliche Ablauf der Therapie stellte sich wie folgt dar: der Monat 0 (m0) kennzeichnet den direkten Zeitpunkt vor Beginn der SIT und liegt außerhalb der Saison (zwischen September und November). Die folgenden drei Monate (m1 bis m3) werden zusammen mit m0 als Aufdosierungs- bzw. Einleitungsphase bezeichnet. Die Erhaltungsphase beginnt nach m3 und erstreckt sich über die Monate m6 bis m36 (Abb. 3).

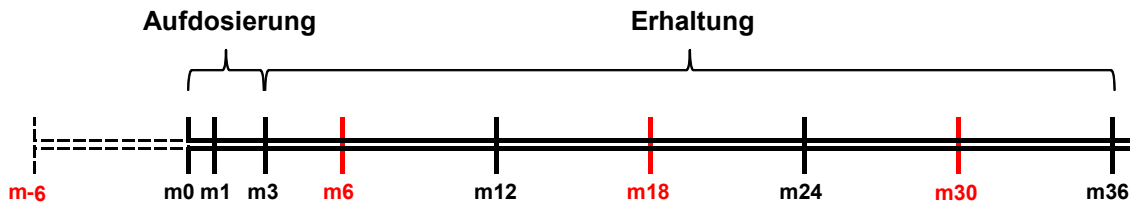


Abb. 3: Zeitlicher Ablauf des Studienprotokolls der spezifischen Immuntherapie

Monat m0 kennzeichnet den Zeitpunkt direkt vor Beginn der spezifischen Immuntherapie. Die Aufdosierungs- bzw. Einleitungsphase erstreckt sich über die Monate m0 bis m3. Der Zeitraum zwischen m3 und m36 markiert die Erhaltungsphase. Der Zeitpunkt m-6 bezeichnet die Birkenpollenflugzeit vor Therapieeinleitung. In der Saison gelegene Punkte sind durch rote Linien markiert. Außerhalb der Saison befindliche Punkte sind durch schwarze Linien gekennzeichnet.

In der Einleitungsphase wurden stufenweise ansteigende Dosen des aufgereinigten und standardisierten Allergenextraktes (ALK-depot SQ) wöchentlich subkutan appliziert, bis eine Erhaltungsdosis von 100.000 standardisierten Qualitäts (SQ)-Einheiten pro Injektion erreicht wurde (Abb. 4). Die SCIT wurde mit monatlicher Gabe der Erhaltungsdosis über drei Jahre fortgesetzt.

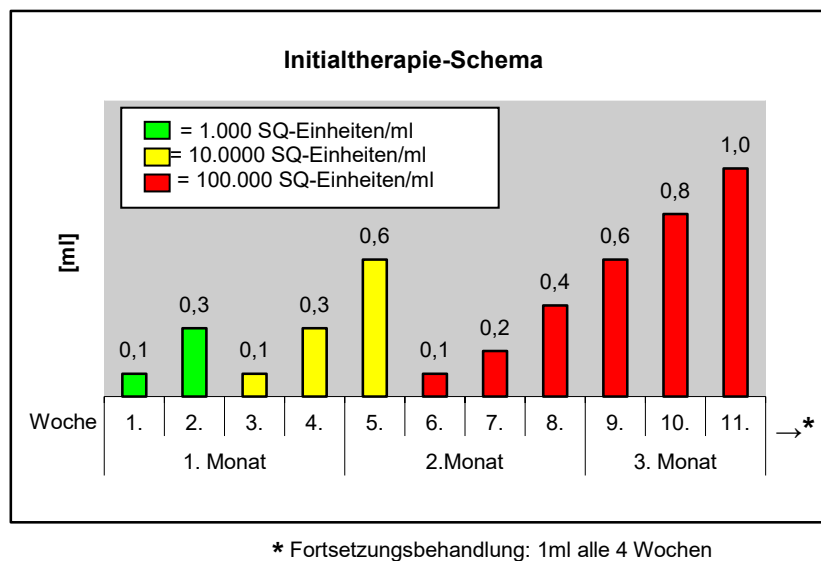


Abb. 4: Behandlungsplan mit verkürzter Aufdosierungsphase für ALK-depot SQ Pollen

Im Schema dargestellt ist der Verlauf der initialen Aufdosierung des Allergenpräparates in den ersten drei Monaten der spezifischen Immuntherapie. Die Fortsetzung in der Erhaltungsphase erfolgte mit 1,0 ml der Allergenlösung (entspricht 100.000 standardisierten Qualitäts (SQ)-Einheiten) alle vier Wochen für die folgenden drei Jahre (modifiziert nach ALK-Scherax).

Die Abnahme des venösen Bluts erfolgte zu den Zeitpunkten m0, m1, m3, m6 und dann im Abstand von sechs Monaten über einen Zeitraum von insgesamt drei Jahren jeweils vor der Allergengabe. Bei den Kontrollgruppen erfolgte die Blutabnahme einmal während saisonaler natürlicher Allergenexposition und einmal außerhalb der Birkenpollensaison. In der Birkenpollensaison liegen die Abnahmezeitpunkte m6, m18 und m30. Außerhalb der Saison befinden sich die Zeitpunkte m12, m24 und m36.

3.2 Klinische Evaluation

Die klinische Evaluation sowie die im folgenden beschriebenen Testungen wurden während der Studie durch ärztliche bzw. technische Mitarbeiter der Allergieambulanz der Klinik für Dermatologie und Allergologie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Die Bewertung der klinischen Wirksamkeit der Therapie erfolgte dabei objektiv durch Hautpricktests und subjektiv durch die Patienten durch die Einordnung ihres Beschwerdebilds auf einer 7-Punkte-Skala.

3.2.1 Hautpricktest

Der Hautpricktest wurde direkt vor Beginn der Immuntherapie (m0) und anschließend im jährlichen Abstand (m12, m24, m36) durchgeführt. Dazu wurde auf die Volarseite des Unterarms eine BPA-haltige Lösung getropft und mit einer Pricklanzette durch den Tropfen hindurch in die Epidermis gestochen. Als Positivkontrolle diente eine 0,1%ige Histaminlösung und als Negativkontrolle physiologische Kochsalzlösung. Die Testlösung wurde nach fünf Minuten abgetupft und nach weiteren 15 Minuten erfolgte die Beurteilung der Hautreaktion relativ zu der Kontrolllösung. Dabei wurden die Größe der Hautrötung (Erythem) und die Quaddelbildung (Urtikaria) numerisch beurteilt:

0 = negativ	→ keine Quaddel, Rötung im Durchmesser nicht größer als 3mm, gleiche Reaktion wie bei der Negativkontrolle
0,5 = fraglich positiv	→ angedeutete Quaddel von 1-2mm, Rötung im Durchmesser 3-4mm
1 = positiv	→ Quaddel mindestens 3mm, Rötung im Durchmesser mindestens 5mm, der Quaddeldurchmesser ist kleiner als bei der Histaminquaddel
2 = positiv	→ Quaddel mindestens 3mm, Rötung im Durchmesser mindestens 5mm, der Quaddeldurchmesser entspricht der Histaminquaddel

- | | |
|-------------|--|
| 3 = positiv | → Quaddel mindestens 3mm, Rötung im Durchmesser mindestens 5mm, der Quaddeldurchmesser ist größer als bei der Histaminquaddel |
| 4 = positiv | → Quaddel mindestens 3mm, Rötung im Durchmesser mindestens 5mm, der Quaddeldurchmesser ist größer als bei der Histaminquaddel und weist zusätzlich Pseudopodien auf. |

3.2.2 Klinischer Symptomscore

Mit dem klinischen Symptomscore (*clinical score*; CS) wurde das subjektive Allgemeinbefinden der Probanden erfasst. Der Schweregrad der allergischen Symptome wurde durch Einordnung auf einer numerischen Skala von 1 bis 7 definiert. Dabei wurde die subjektive Bewertung „überhaupt nicht krank“ (1), „Grenzfall allergischer Erkrankung“ (2), „nur leicht krank“ (3), „mäßig krank“ (4), „deutlich krank“ (5), „schwer krank“ (6) bzw. „extrem schwer krank“ (7) der jeweils nachstehenden Ziffer zugeordnet. Die Datenerfassung/-abfrage erfolgte bei den SIT-Patienten in der Pollenflugsaison vor Beginn der Therapie (m-6) und in den drei darauf folgenden Birkenpollenexpositionszeiten (m6, m18 und m30; vgl. Abb. 5). Bei den rein symptomatisch therapierten Allergikern wurde der Schweregrad der allergischen Erkrankung in zwei aufeinander folgenden Pollenflugzeiten dokumentiert.

3.3 Zelluläre Diagnostik

Die Untersuchungen wurden mittels PBMC durchgeführt, die aus CPDA (Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin)-versetztem Vollblut mittels Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert wurden. Für die Langzeitaufbewahrung wurden die PBMC-Proben in einer Konzentration von $5\text{--}10 \times 10^6$ PBMC/ml in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.3.1 Primärstimulation peripherer mononukleärer Blutzellen

Die Stimulation der PBMC zur Zytokinproduktion erfolgte durch das Birkenpollenallergen Bet v 1. Die PBMC-Proben wurden zunächst in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurden sie in kaltes RPMI⁺⁺ überführt, abzentrifugiert (1300rpm, 10min, 4°C) und der Überstand danach verworfen. Die PBMC wurden in RPMI⁺⁺+10%PHS resuspendiert und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt (vgl. 3.3.2). Die Zellen wurden in einer Konzentration von 10^6 PBMC/ml in zwei

Kavitäten einer sterilen 24-*well* (Loch)-Platte pipettiert. Eine der Kavitäten wurde mit 10µg/ml Bet v 1 versetzt, die andere diente als unstimulierte Kontrolle. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten mit 5% CO₂ versetzten Umgebung. Nach Evaluation der optimalen Stimulationsdauer (vgl. Kapitel 4.1) wurden die Überstände (220µl) zu folgenden Zeitpunkten abgenommen:

IL-5: nach sieben Tagen

IFN γ : nach sieben Tagen

IL-10: nach drei Tagen

TGF- β : nach drei Tagen und nach sieben Tagen.

Die gewonnenen Zellüberstände wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3.2 Zellzahlbestimmung

Die Auszählung der lebenden Zellen innerhalb der PBMC-Suspension wurde standardmäßig in der Neubauer-Zählkammer mittels Trypanblau-Färbung durchgeführt. Dazu wurde die Zellsuspension mit 0,4%iger Trypanblau-Lösung (Verdünnung 1:2) gefärbt. Trypanblau bindet mit seinen Farbstoff-Anionen an zytosolische Proteine und wird aufgrund der veränderten Membrandurchlässigkeit nur von den toten Zellen aufgenommen.

Unter dem Lichtmikroskop erfolgte anschließend die Auszählung der lebenden (farblosen) Zellen in allen vier Großquadranten der Zählkammer. Zur Berechnung der Zellzahl/ml Zellsuspension wurde folgende Formel herangezogen: Zellzahl/ml = Mittelwert der Zellzahl aus den vier Großquadranten x Verdünnung x Kammerfaktor.

3.4 Serologische Diagnostik

Die Untersuchungen wurden mittels ELISA durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen serologischen Test, der gebundene Antigene oder Antikörper mithilfe eines gekoppelten Enzyms nachweist. Das Enzym wandelt eine farblose Substanz in ein farbiges Produkt um. Die Menge des gebildeten Produkts kann photometrisch gemessen und quantifiziert werden. Für die Quantifizierung des ELISA wurde ein Standard mit genauer Konzentrationsangabe mitgeführt. Daraus wurde eine Verdünnungsreihe erstellt und die optische Dichte (OD) der Verdünnungsreihe gegen die Konzentration auf einer Eichgeraden aufgetragen. Anhand dieser Eichgeraden konnten die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

Zur Detektion der einzelnen Zytokine wurde ein sogenannter „Sandwich-ELISA“ verwendet, da die zu untersuchenden Blutseren aus einem umfangreichen

Proteingemisch bestehen. Beim *Sandwich*-ELISA werden zwei Antikörper, die für zwei unterschiedliche Epitope eines größeren Antigens spezifisch sind, eingesetzt. Der erste spezifische Antikörper („*capture antibody*“) ist an eine Festphase gebunden („*immunosorbent*“) und hat die Aufgabe, das Antigen zu binden. Der zweite Antikörper („*detection antibody*“), an den ein geeignetes Enzym gekoppelt wurde, dient dem Antigennachweis. Das Enzym ist in der Lage zugegebenes Substrat umzusetzen, welches dadurch seine Farbe ändert. Die Farbintensität wird anschließend photometrisch gemessen und zur indirekten Quantifizierung der Ergebnisse verwendet (Gan and Patel, 2013; Hahn et al., 2008, S. 141).

Die Durchführung des ELISA erfolgte gemäß den Herstellerangaben der ELISA OptEIA™ -Sets für humanes IL-5, IFN γ , IL-10 und TGF- β_1 der Firma Becton Dickinson GmbH nach folgendem Protokoll (siehe auch Abb. 5):

1. Verdünnung des jeweiligen *capture antibody* mit PBS-Puffer, Beschichtung mit je 100 μ l pro *well*; Inkubation für 20h bei 4°C,
2. dreimaliges Waschen mit Waschpuffer (PBS+0,1% Tween 20),
3. Blockierung des überschüssigen *capture antibody* mit \geq 200 μ l PBS+10% FCS pro *well*, Inkubation für 1h bei Raumtemperatur (RT),
4. dreimaliges Waschen mit Waschpuffer (PBS+0,1% Tween 20),
5. Erstellung der Verdünnungsreihe des mitgelieferten Standards laut Anleitung mit PBS+10% FCS,
6. Standard sowie Proben zu je 100 μ l pro *well* auftragen, jeweils in zweifacher Ausfertigung; Inkubation für 2h bei RT,
7. fünfmaliges Waschen mit Waschpuffer (PBS+0,1% Tween 20),
8. Zweitantikörper (*detection antibody*) mit Enzymreagenz (*avidin-horseradish peroxidase conjugate*) und PBS+10% FCS mit jeweils 100 μ l pro *well* auf die Platten pipettieren; Inkubation für 1h bei RT,
9. siebenmaliges Waschen mit Waschpuffer (PBS+0,1% Tween 20),
10. Zugabe von 100 μ l Substratlösung (Tetramethylbenzidine und Wasserstoffperoxid); Inkubation für 30 min im Dunkeln bei RT,
11. Abstoppen der Reaktion mit jeweils 50 μ l Schwefelsäure (1 N),
12. indirekte Messung der Proben über die Farbintensität mittels ELISAreader bei 450 nm und λ Korrektur bei 570 nm.

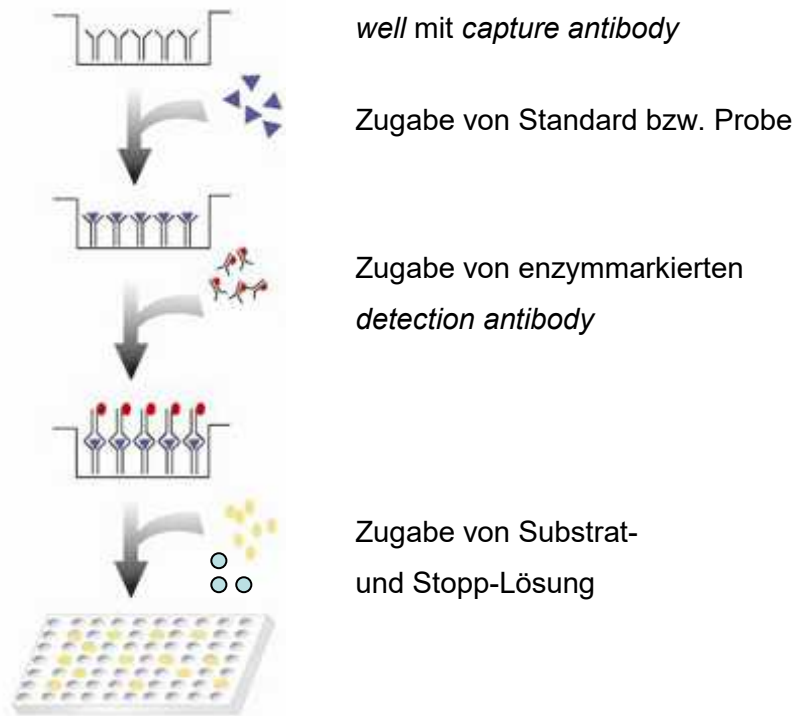


Abb. 5: Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

Abgebildet ist eine vereinfachte schematische Darstellung des *enzyme-linked-immunosorbent-assay* (ELISA)-Protokolls. Nachdem der erste spezifische Antikörper (*capture antibody*) an die Festphase der Platte gebunden hat, werden die zu untersuchenden Proben oder der Standard hinzugegeben. Um die Menge der gebundenen Probe bzw. des Standards detektieren zu können, wird ein zweiter enzymmarkierter Antikörper (*detection antibody*) hinzugefügt. Nach Ergänzung eines Substrats erfolgt dessen Umsetzung durch das an den zweiten Antikörper gebundene Enzym. Die dabei stattfindende Farbänderung des Substrats wird nach einer definierten Zeit gestoppt. Sie wird photometrisch gemessen und zusammen mit den Standarddaten zur Quantifizierung der Ergebnisse verwendet (modifiziert nach www.signosisinc.com, 04.09.2010).

Die Sensitivität der verwendeten ELISA betrug 7,8 pg/ml für IL-5, 4,7 pg/ml für IFN γ , 7,8 pg/ml für IL-10 und 62,5 pg/ml für TGF- β .

3.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS 20.0. Es wurden nicht-parametrische Tests eingesetzt, da die ermittelten Patienten-Daten keine Normalverteilung aufwiesen. Zum Vergleich von zwei verbundenen Stichproben der SIT-behandelten Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten der Therapie wurde der Wilcoxon-Test angewendet. Die Gegenüberstellung von zwei verschiedenen Gruppen erfolgte mittels zweiseitigen Mann-Whitney-U-Tests. Das Signifikanzniveau α wurde auf 0,05 festgesetzt. Damit sind signifikante Unterschiede bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p) von $p < 0,05$ festzustellen.

Bei der graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden die individuellen Probandendaten (Allergiker unter SIT = ●, Allergiker-Kontrollgruppe = ■, Nicht-Allergiker-Kontrollgruppe = △) und der Median (durchgängige Linie) im Verlauf der Therapie abgebildet.

Zur Berechnung des Verhältnisses IL5- zu IL-10 bzw. IL-5 zu IFN γ wurden Null-Werte arbiträr durch die Zahl 1 ersetzt.

Die Darstellung der Zytokinlevel erfolgte als Δ -Wert (unstimulierte Probe subtrahiert von stimulierter Probe).

4 Ergebnisse

4.1 Kinetik der allergenspezifischen Zytokinproduktion

Die Stimulation der PBMC zur Zytokinproduktion erfolgte mit dem Birkenpollenallergen Bet v 1. Um die optimale Zeitspanne der maximalen Zytokinexpression nach Allergenstimulus festzustellen, wurden zunächst 14 bzw. 15 Patienten-Proben mit Bet v 1 versetzt. Die Proben stammten von allen drei Probandenkohorten, d.h. sowohl von SIT-behandelten Patienten als auch von unbehandelten Allergikern und von Probanden ohne Allergiemanifestation. Nach drei, fünf und sieben Tagen (d) erfolgte die Abnahme der Zellkulturüberstände. Zur quantitativen Messung der produzierten Zytokinmenge in den Überständen wurde das ELISA-Verfahren verwendet.

Die spezifische IL-5-Produktion war an Tag sieben nach Bet v 1-Stimulation am höchsten (Abb. 6). Daher wurde die Stimulationsdauer bis zur Abnahme der Überstände für IL-5 auf d7 festgelegt.

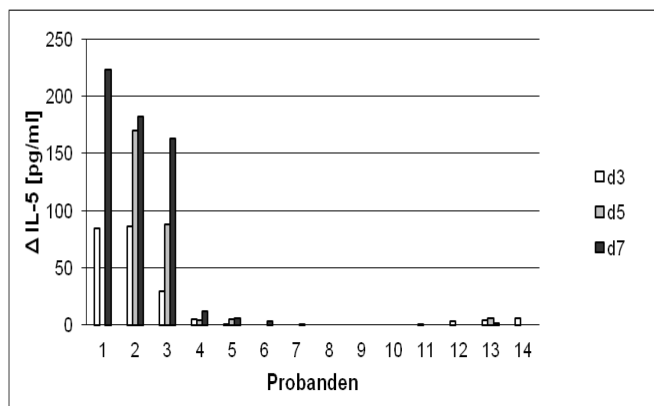


Abb. 6: Bet v 1-spezifische Interleukin 5-Produktion

Die Interleukin (IL)-5-Produktion ist sieben Tage (d) nach Stimulation mit dem Birkenpollenallergen Bet v 1 am höchsten. Die mit dem ELISA-Verfahren ermittelten Daten stellen die IL-5-Produktion durch PBMC dar.

Die Bet v 1-spezifische IFN γ -Produktion (Abb. 7) war an d3, d5 und d7 erhöht. Bei Betrachtung des Medians zeigten jedoch d5 (Median 4,3) und d7 (Median 4,3) deutlich höhere Werte als d3 (Median 1,6). Da die Mediane an d7 und an d5 keine Unterschiede zeigten, wurde in Anlehnung an das Studienprotokoll von IL-5 die Abnahme der Überstände auf d7 determiniert.

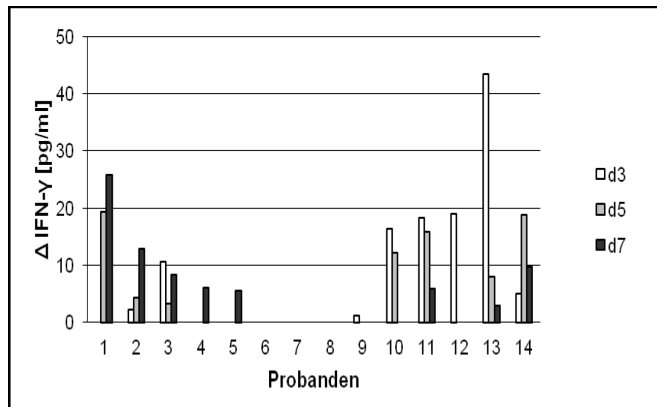


Abb. 7: Bet v 1-spezifische Interferon γ -Produktion

Abgebildet ist die Interferon (IFN) γ -Produktion drei (d3), fünf (d5) und sieben (d7) Tage (d) nach Stimulation mit dem Birkenpollenallergen Bet v 1. Der Median der Daten (nicht dargestellt) liegt an d3 bei 1,6 und an d5 und d7 bei 4,3. Die mit dem ELISA-Verfahren ermittelten Daten stellen die IFN γ -Produktion durch PBMC dar.

Die maximale IL-10-Produktion wurde bereits an d3 erreicht (Abb. 8). Bei 60% (9/15) der Probanden ließ sich bereits zu diesem Zeitpunkt die höchste Zytokinexpression feststellen.

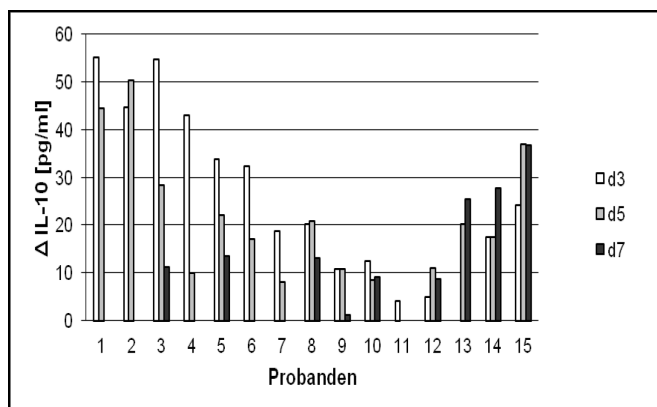


Abb. 8: Bet v 1-spezifische Interleukin 10-Produktion

Dargestellt ist die Interleukin (IL)10-Freisetzung nach drei- (d3), fünf- (d5) und siebentägiger (d7) Stimulation mit dem Birkenpollenallergen Bet v 1. An d3 konnte in den Zellüberständen eine maximale Zytokinkonzentration festgestellt werden. Die mit dem ELISA-Verfahren ermittelten Daten stellen die IL-10-Produktion durch PBMC dar.

Bei der Auswertung der Daten für TGF- β konnte lediglich in drei Fällen eine Bet v 1-spezifische TGF- β -Freisetzung gemessen werden. Zwei der 14 Probanden zeigten eine Expression an d7 und ein Proband an d5. Da diese Ergebnisse keinen eindeutigen Schluss zulassen, wurde im Studienprotokoll die Abnahme der TGF- β -Überstände zur Vergleichbarkeit mit den anderen Parametern für d3 und d7 festgelegt.

4.2 Einfluss der spezifischen Immuntherapie auf Birkenpollenallergiker

4.2.1 Klinische Wirksamkeit der spezifischen Immuntherapie

Der Therapieverlauf der SIT von elf Birkenpollenallergikern wurde über einen Zeitraum von drei Jahren aufgezeichnet. Die Bewertung der klinischen Wirksamkeit der Therapie erfolgte dabei objektiv durch Hautpricktests und subjektiv durch die Einordnung des klinischen Beschwerdebildes auf einer 7-Punkte-Skala (vgl. 3.2).

Der jeweils während des Birkenpollenflugs erhobene Schweregrad der allergischen Erkrankung zeigte bereits sechs Monate nach Beginn der SIT einen klinischen Effekt der Behandlung. Im Vergleich zur Birkenpollensaison vor Therapie (m-6) mit einem „mäßig kranken“ Beschwerdebild gaben die Patienten in der ersten Saison unter Therapie ein verbessertes Befinden mit einer „nur leichten“ Erkrankung an (Abb. 9A). In den folgenden Pollenflugzeiten blieb der von den Patienten angegebene Schweregrad der allergischen Erkrankung hinsichtlich der Angabe vor Therapiebeginn signifikant reduziert (m18: $p = 0,007$, m30: $p = 0,019$).

Unter SIT ließ sich im Pricktest zusätzlich eine verringerte Hautreaktion auf das BPA feststellen. Verglichen mit den Ausgangswerten vor der SIT zeigten die außerhalb der Birkenpollensaison erhobenen Daten über den gesamten dreijährigen Therapiezeitraum eine signifikant verminderte Reaktivität gegenüber dem Allergenextrakt (m12: $p = 0,006$, m24: $p = 0,004$, m36: $p = 0,011$; Abb. 9B).

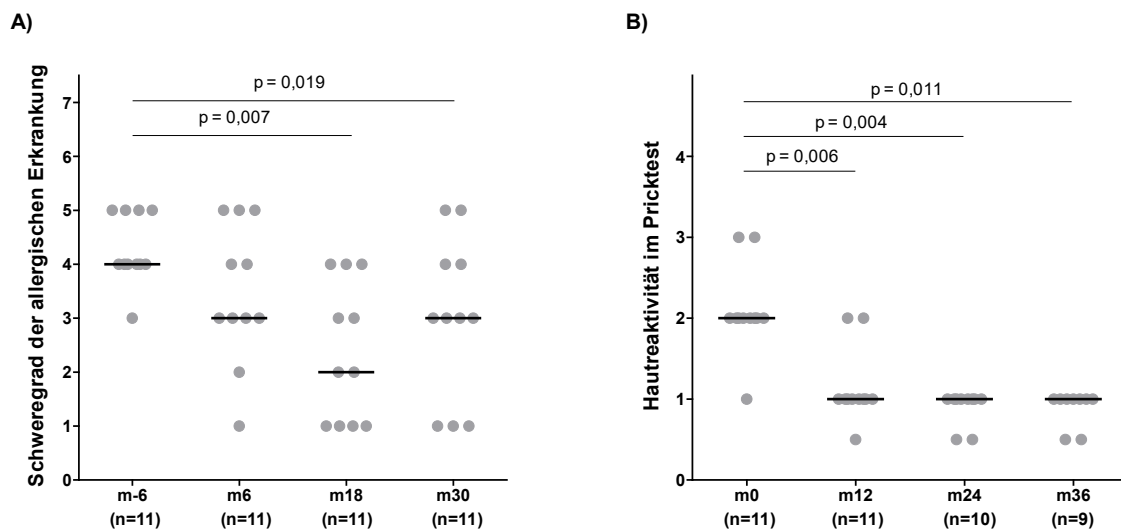


Abb. 9: Klinische Symptomatik unter spezifischer Immuntherapie (SIT) mit Birkenpollenallergen

Dargestellt ist der klinische Symptomscore (A), welcher die subjektive Einschätzung des Schweregrads der allergischen Erkrankung der Patienten während der Pollenflugsaison über den dreijährigen Beobachtungszeitraum der SIT erfasste. Die Einordnung erfolgte auf einer 7-Punkte-Skala, wobei 1 „überhaupt nicht krank“ und 7 „extrem schwer krank“ bedeutete. In der ersten Pollenflugzeit (m6) sank der Symptomscore bereits unter das Niveau der Vorsaison (m-6) ohne Immuntherapie. Auch in der zweiten (m18) und dritten (m30) Birkenpollensaison zeigte sich eine signifikante Verbesserung des klinischen Beschwerdebildes im Vergleich zur Birkenpollenflugzeit vor Therapiebeginn. Die klinische Wirksamkeit der spezifischen Immuntherapie wurde ebenfalls durch eine verminderte allergische Hautreaktion auf Birkenpollenallergen im Pricktest (B) bestätigt. Hierfür wurden die Daten im Bewertungsmaßstab von 0 (keine Reaktion) bis 4 (starke Reaktion) im jährlichen Abstand außerhalb der Birkenpollensaison (m0, m12, m24, m36) erfasst. Im Vergleich zu den Ausgangswerten bei Therapiebeginn (m0) war zu den folgenden Messzeitpunkten eine signifikant reduzierte Hautreaktion zu dokumentieren. Statistische Veränderungen ($p < 0,05$) wurden mit Hilfe des zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ermittelt.

4.2.2 Zytokinproduktion der Bet v 1-spezifischen T-Zellpopulationen

Im Behandlungsspektrum der klinischen Allergologie stellt die SIT seit Jahrzehnten eine klassisch kausale Behandlungsmethode dar. Ihre klinische Effektivität wurde in zahlreichen Studien bestätigt. Um ihre modulierende Wirkung auf den zellulären Bereich der Immunantwort zu untersuchen, wurde in dieser Studie die Zytokinproduktion der PBMC der SIT-behandelten Birkenpollenallergiker quantitativ mittels ELISA bestimmt, und zwar anhand von Blutproben, welche zu definierten Zeitpunkten (vgl. 3.1.3) während der SIT innerhalb und außerhalb der Saison entnommen wurden. Ein besonderes Augenmerk wurde hierbei auf den Vergleich der Aufdosierungsphase der SIT (erste drei Monate) mit der anschließenden Erhaltungsphase sowie auf die saisonalen Einflüsse durch die zusätzliche natürliche Allergenexposition während des Birkenpollenflugs gelegt. Zur Untersuchung von zellulären Veränderungen wurde die Bet v 1-spezifische Sekretion der Zytokine IL-5,

IFN γ , IL-10 und TGF- β in den Blutproben quantitativ erfasst, da sie Marker für bestimmte T-Zellpopulationen repräsentieren, für die im Rahmen einer SIT-Behandlung eine bedeutsame Rolle diskutiert wird.

Die Analyse der allergenspezifischen IL-5-Konzentration (Abb. 10) zeigte zum Ende der Aufdosierungsphase (m3) eine erhöhte IL-5-Produktion. Mit Beginn der folgenden Erhaltungsphase konnten im Vergleich der Mediane zusätzliche saisonale Anstiege detektiert werden. Im weiteren Therapieverlauf ließ sich jedoch eine zunehmende Abschwächung dieser IL-5-Maxima verzeichnen, welche sich durch eine signifikante Reduktion ($p = 0,025$) in der dritten Saison (m30) in Bezug auf die zweite (m18) Birkenpollenflugzeit dokumentieren ließ.

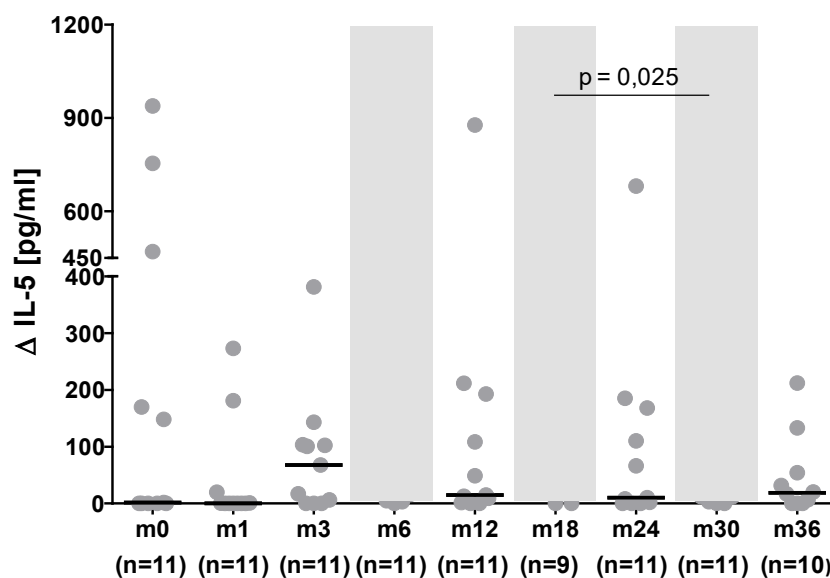


Abb. 10: Bet v 1-spezifische Interleukin 5-Produktion unter spezifischer Immuntherapie (SIT)

Dargestellt ist die Interleukin (IL)-5-Konzentration in den Seren der mit einer SIT behandelten Allergiker. Erkennbar sind die saisonalen (m6, m18, m30, grau hinterlegt) Anstiege in der IL-5-Konzentration, die im Verlauf der SIT schwächer wurden. Eine signifikante Reduktion konnte in der dritten (m30) Saison im Vergleich mit der zweiten (m18) Saison dokumentiert werden. Die mit dem ELISA-Verfahren ermittelten Werte stellen die Bet v 1-spezifische IL-5-Zytokinproduktion dar. Statistische Veränderungen ($p < 0,05$) wurden mit Hilfe des zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests ermittelt.

Die spezifische IFN γ -Sekretion (Abb.11) wurde weder durch die SIT noch durch den Pollenflug erheblich beeinflusst und hatte ein insgesamt niedriges Niveau. Jedoch ließ sich neben einem tendenziellen Anstieg im Anschluss an die erste Pollenflugzeit (m12) eine signifikante Abnahme zu den Zeitpunkten m3 und m30 im Vergleich zum Beginn der Therapie detektieren.

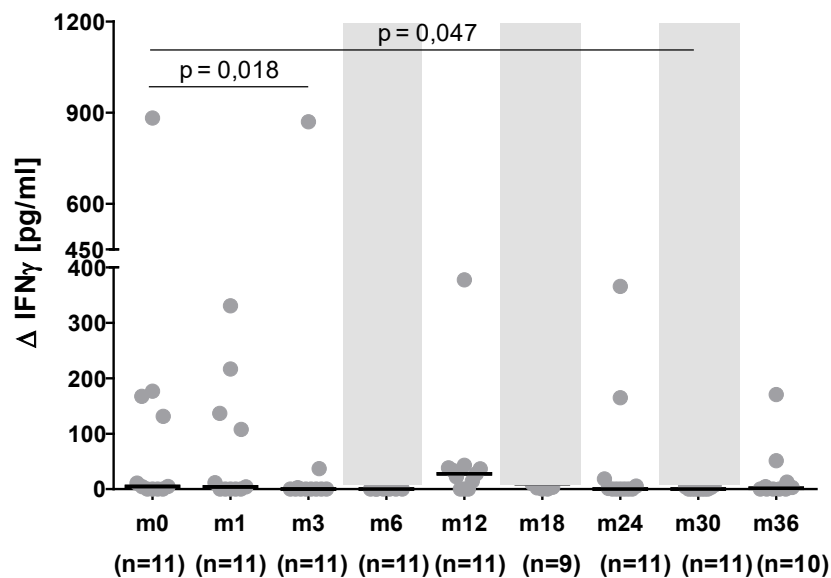


Abb. 11: Bet v 1-spezifische Interferon γ -Produktion unter spezifischer Immuntherapie

Die Interferon (IFN) γ -Produktion erreichte in Monat (m)12, d.h. im Anschluss an die erste Pollenflugsaison, ihr Maximum. Eine signifikante Abnahme war, verglichen mit den Ausgangswerten bei m0, bei m3 und m30 zu verzeichnen. Die mit dem ELISA-Verfahren ermittelten Werte stellen die Zytokinproduktion nach Bet v 1-Stimulus dar. Statistische Veränderungen ($p < 0,05$) wurden mit Hilfe des zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests ermittelt.

Während der dreijährigen SIT konnten dagegen keine signifikanten Veränderungen der IL-10-Sekretion der PBMC (Abb. 12) beobachtet werden. In der ersten Birkenpollensaison zeigte sich ein diskreter Anstieg der IL-10-Produktion, danach im Vergleich zum basalen Wert vor SIT-Einleitung nicht mehr.

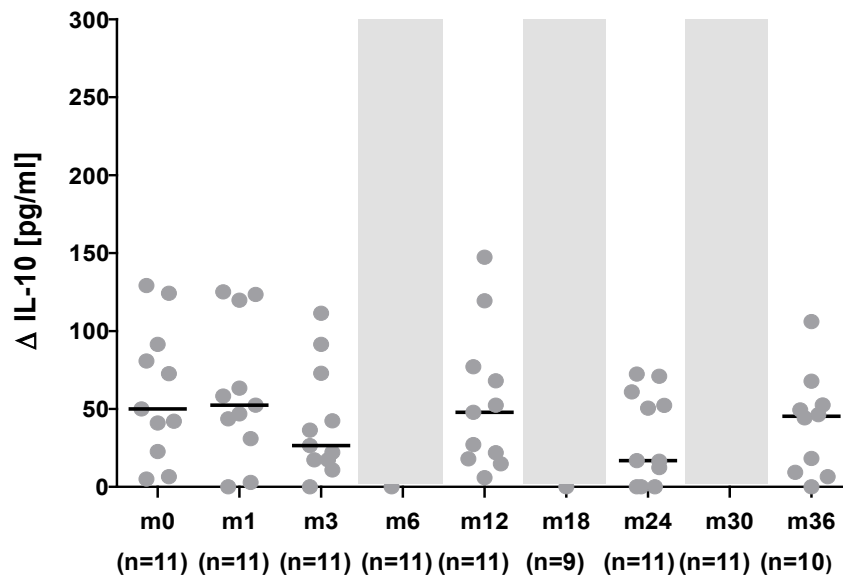


Abb. 12: Bet v 1-spezifische Interleukin 10-Produktion unter spezifischer Immuntherapie (SIT)

Im Verlauf der SIT waren keine signifikanten Veränderungen in der Interleukin (IL-10)-Sekretion zu verzeichnen, wobei ein tendenzieller Anstieg in der ersten Pollensaison (m6) dokumentiert werden konnte. Die mit dem ELISA-Verfahren ermittelten Werte stellen die Zytokinproduktion nach Bet v 1-Stimulus dar.

Die Werte der TGF- β -Produktion wurden sowohl nach dreitägiger als auch nach siebentägiger Stimulation mit Bet v 1 erhoben. Die Analyse ergab jedoch keine erkennbaren Veränderungen über den dreijährigen Therapiezeitraum. Lediglich vereinzelte Extremwerte waren vorhanden (Daten nicht gezeigt).

Abschließend sind die Ergebnisse der allergenspezifischen Zytokinexpression unter SIT noch einmal in Abbildung 13 zusammenfassend dargestellt. Die Betrachtung der Konzentrationsveränderungen der Zytokine IL-5, IFN γ und IL-10 unter SIT ließ einen deutlichen IL-5-Anstieg zu Beginn der SIT mit einem Maximum während der ersten Birkenpollensaison (m6) erkennen. Durch die sukzessive Abnahme der saisonalen IL-5-Sekretion kam es im weiteren Therapieverlauf zu einer Annäherung an das IL-10-Niveau mit tendenziell parallelem Verlauf der Zytokinsekretion. Quantitativ scheint Bet v 1-spezifisches IFN γ eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Ausschließlich zum Zeitpunkt m12 konnte eine diskrete Zunahme der IFN γ -Produktion detektiert werden.

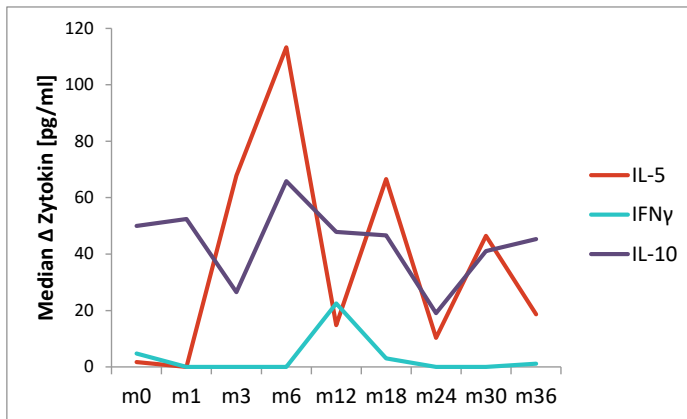


Abb. 13: Allergenspezifische Zytokinproduktion unter spezifischer Immuntherapie (SIT)

Vergleichend dargestellt ist die allergenspezifische Sekretion der Zytokine Interleukin (IL)-5, Interferon (IFN) γ und IL-10 unter dem Einfluss einer dreijährigen SIT. Abgebildet ist jeweils der Verlauf des Medians. Deutlich zu erkennen sind dabei die Anstiege der IL-5-Konzentration in der Birkenpollensaison (m6, m18, m30), welche mit zunehmendem Therapieverlauf deutlich geringer ausfallen. Die IFN γ -Produktion steigt außerhalb der Saison zum Zeitpunkt m12 einmalig an. Nach einer Zunahme der IL-10-Sekretion in der ersten Saison erfolgt während der weiteren SIT eine Absenkung auf das Anfangsniveau. Die mit dem ELISA-Verfahren ermittelten Werte stellen die Zytokinproduktion nach Bet v 1-Stimulus dar.

4.2.3 Anteil der Bet v 1-spezifischen Zytokinproduktion an der Gesamtheit der exprimierten Zytokine

Zur Ermittlung des Anteils der allergenspezifischen Zytokinsekretion an der gesamten Menge des jeweils sezernierten Zytokins wurden die aus dem peripheren Blut der SIT-behandelten Probanden isolierten PBMC nicht nur in vitro mit Bet v 1 stimuliert, sondern auch unstimuliert belassen (vgl. 3.3.1). Anhand der in der unstimulierten Probe vorhandenen Zytokine ließ sich die basale unspezifische Zytokinproduktion ermitteln, so dass die Differenz der Zytokinmenge in stimulierter und unstimulierter Probe den Anteil des Bet v 1-spezifischen Zytokins ergab.

Die Auswertung der IL-5-Produktion (Abb. 14) unter den in Vorversuchen ermittelten optimalen Bedingungen zeigte im Median über den gesamten Therapieverlauf keine IL-5-Freisetzung ohne Bet v 1-Stimulus. Dies weist darauf hin, dass die in der Kultur vorhandenen Th2-Zellen hochspezifisch für Bet v 1 waren.

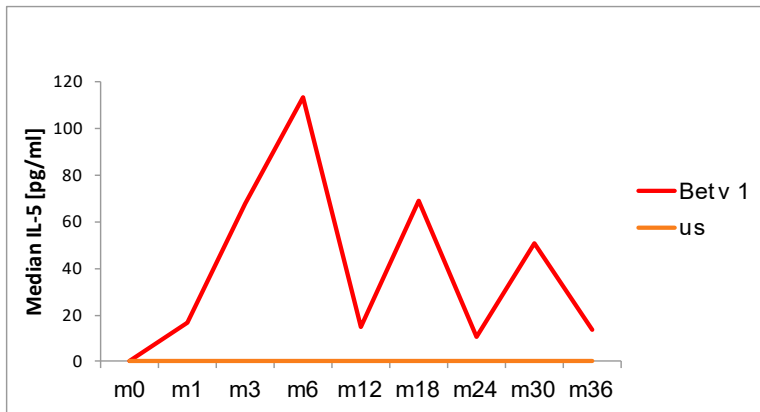


Abb. 14: Induktion der Interleukin 5-Produktion durch die spezifische Immuntherapie

Die Konzentration des in den mit dem Birkenpollenallergen Bet v 1 stimulierten Proben gebildeten Interleukin (IL)-5 ist durch den Verlauf der roten Linie gekennzeichnet. Die orangene Linie markiert IL-5, welches ohne spezifischen Stimulus entstanden ist. Die Fläche zwischen den beiden Linien beschreibt das Bet v 1-spezifische IL-5. Die Untersuchung der Zytokinproduktion zeigte (im Median) keine IL-5-Produktion in den unstimulierten (us) Proben. Die Werte der IL-5-Zytokinproduktion wurden mit dem ELISA-Verfahren ermittelt. Dargestellt ist jeweils der Median.

Das Zytokin IFN γ (Abb. 15) wurde hingegen sowohl in den stimulierten als auch in den unstimulierten Proben freigesetzt. Die unspezifische IFN γ -Produktion war zu den Zeitpunkten m6, m24 und m30 besonders ausgeprägt. Eine gegen Null tendierende Bet v 1-unabhängige IFN γ -Sekretion war zum Zeitpunkt m12 festzustellen.

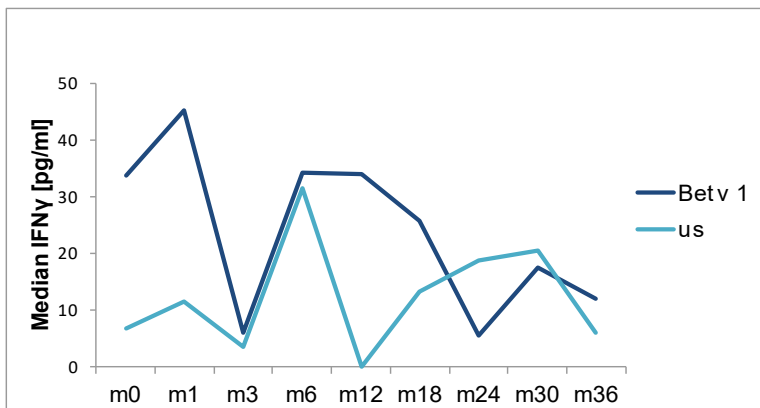


Abb. 15: Induktion der Interferon γ -Produktion durch die spezifische Immuntherapie

Die dunkelblaue Linie kennzeichnet die Interferon (IFN) γ -Konzentration, welche in den mit Birkenpollenallergen Bet v 1 stimulierten Proben entstanden ist. Der Basallevel, d.h. ohne Bet v 1-Stimulation (us) entstandenes IFN γ , ist durch den Verlauf der hellblauen Linie abgebildet. Die Werte der IFN γ -Zytokinproduktion wurden mit dem ELISA-Verfahren ermittelt. Dargestellt ist jeweils der Median.

Ähnlich wie bei IFN γ zeigte die Auswertung der IL-10-Produktion (Abb. 16) eine Freisetzung sowohl in den stimulierten als auch in den unstimulierten Proben. Der Anteil an unspezifisch produziertem IL-10 an der Gesamtzytokinmenge (maximal 57%) war jedoch weitaus geringer als der des IFN γ , so dass zu jedem Zeitpunkt eine Bet v 1-spezifische IL-10-Produktion detektiert werden konnte.

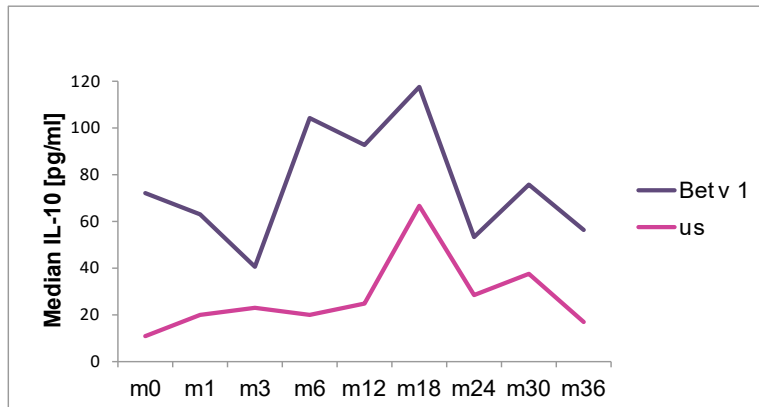


Abb. 16: Induktion der Interleukin 10-Produktion durch die spezifische Immuntherapie

Die dunkelviolette Linie kennzeichnet das in den mit Birkenpollenallergen Bet v 1 stimulierten Proben entstandene Interleukin (IL)-10. Ohne Bet v 1-Stimulation, das heißt unstimuliert (us) entstandenes IL-10, ist durch den Verlauf der hellvioletteten Linie abgebildet. Die Werte der IL-10-Zytokinproduktion wurden mit dem ELISA-Verfahren ermittelt. Dargestellt ist jeweils der Median.

Eine unspezifische TGF- β -Produktion konnte zwar vereinzelt bei drei Probanden nachgewiesen werden, war aber nicht relevant.

4.2.4 Proportionale Veränderungen der Zytokinkonzentration unter der spezifischen Immuntherapie

Zusätzlich zu der in 4.2.2 betrachteten Menge der jeweils sezernierten Zytokinklasse scheint auch das Verhältnis zwischen den verschiedenen zytokinproduzierenden T-Zellpopulationen ein bestimmender Faktor für den Schweregrad der allergischen Erkrankung zu sein (Akdis et al., 2004). Dabei werden in diesem Zusammenhang die Th2-Zellen als potentielle Förderer einer allergischen Immunantwort angesehen, Th1- und Tr1-Zellen hingegen gelten als die eher protektiv wirkenden T-Zellsubpopulationen. So wurde im Zusammenhang mit der Entwicklung einer Allergie in zahlreichen Studien ein erhöhtes Th2/Th1-Zellverhältnis beschrieben, dessen Korrektur als eine Grundlage für eine Verbesserung der allergischen Symptome gesehen wird (Akdis et al., 2004; Bohle et al., 2007; Ebner et al., 1997; Romagnani, 2006). Gleichzeitig spielen möglicherweise immunsuppressive Treg-Zellen für die

Wiederherstellung der Immunhomöostase bei Allergikern eine bedeutsame Rolle (Bellinghausen et al., 2003; Thunberg et al., 2007; Torgerson, 2006). Im Folgenden soll daher das Verhältnis der Th2-Zellen zu den Th1- und Tr1-Zellen anhand des für die jeweilige Zellpopulation relevanten Zytokins IL-5, IFN γ und IL-10 genauer betrachtet werden.

Für den IL-5/IFN γ -Quotienten (Abb. 17) konnte in den ersten beiden Therapiemonaten ein ausgeglichenes Verhältnis der beiden Zytokine dokumentiert werden, d.h. der Quotient war weder in Richtung des Zytokins IL-5 noch in Richtung des Zytokins IFN γ verschoben. Danach war das IL-5/IFN γ -Verhältnis saisonal IL-5 dominiert. Verglichen mit dem Therapiebeginn konnte nach zwei Jahren (m24) ein signifikanter Anstieg ($p = 0,037$) festgestellt werden, welcher sich auch in der Birkenpollensaison des nächsten Jahres (m30) fortsetzte ($p = 0,01$), ein tendenzieller Abfall mit Annäherung an den Ausgangswert war zum Therapieende darstellbar. Ein Wechsel von einem IL-5 geprägten zu einem IFN γ dominierten Verhältnis konnte jedoch zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden.

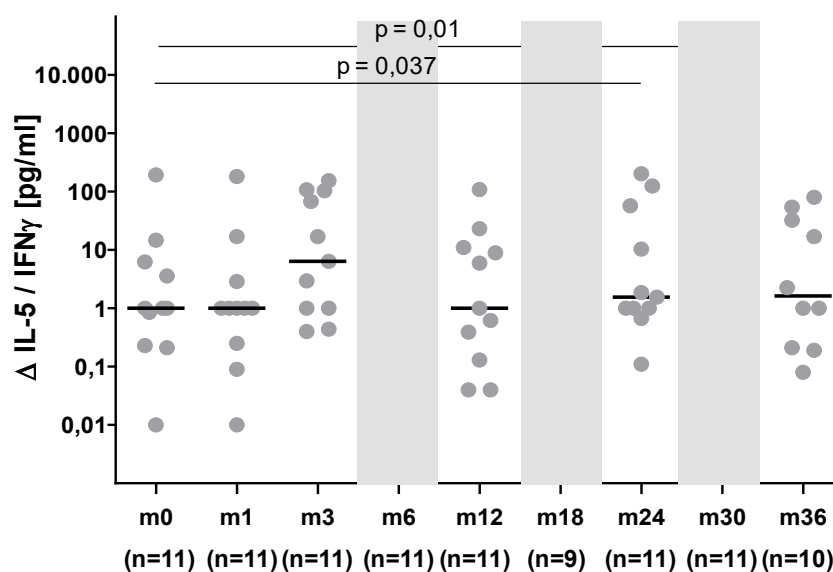


Abb. 17: Auswirkungen der spezifischen Immuntherapie (SIT) auf das Verhältnis von sezerniertem Interleukin 5 zu Interferon γ nach Bet v 1-Stimulation

Dargestellt ist das Verhältnis der Interleukin (IL)-5-Produktion zur Interferon (IFN) γ -Freisetzung nach Stimulation mit Bet v 1. Verglichen mit dem Ausgangswert bei m0 ist ein Anstieg des Quotienten zum Zeitpunkt m24 und m30 zu verzeichnen. Weitere signifikante Veränderungen sind im Verlauf der SIT nicht zu beobachten. Die mit dem ELISA-Verfahren ermittelten Werte stellen das Verhältnis der Zytokinproduktion von IL-5 zu IFN γ nach Bet v 1-Stimulus dar. Statistische Veränderungen ($p < 0,05$) wurden mit Hilfe des zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests ermittelt.

Auswirkungen auf das Verhältnis von allergenspezifischem IL-5 zu IL-10 sind hauptsächlich während des saisonalen Pollenflugs auszumachen. In den ersten beiden Pollenflugzeiten nach Beginn der SIT war der IL-5/IL-10-Quotient (Abb. 18) deutlich IL-5 geprägt. Eine Verschiebung dieses Ungleichgewichts in Richtung IL-10 fand in der dritten Saison mit einer signifikanten Reduktion ($p = 0,021$) des IL-5/IL-10-Quotienten im Vergleich zur Vorsaison statt. Zum Ende der Therapie ließ sich ein weiterer Abfall des IL-5/IL-10-Verhältnisses verzeichnen.

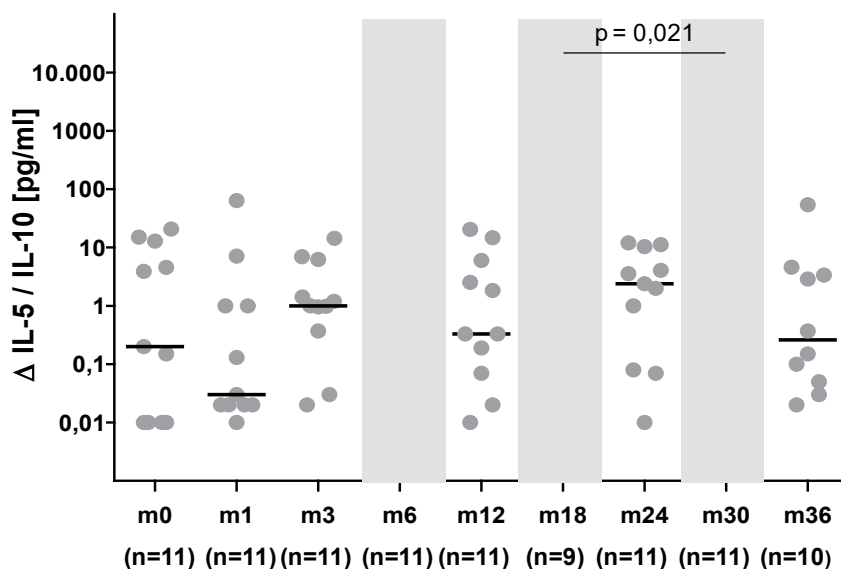


Abb. 18: Auswirkungen der spezifischen Immuntherapie auf das Verhältnis von sezerniertem Interleukin 5 zu Interleukin 10 nach Bet v 1-Stimulation

Dargestellt ist das Verhältnis der Interleukin (IL)-5 Produktion zur IL-10 Freisetzung nach Stimulation mit Bet v 1. Verglichen mit dem Ausgangswert bei m0 waren keine signifikanten Veränderungen im Verlauf der dreijährigen Therapie (m0-m36) zu erkennen. Ein Vergleich der Werte innerhalb der Birkenpollensaison (m6, m18, m30) zeigte jedoch eine signifikante Abnahme des Quotienten von m18 zu m30. Die mit dem ELISA-Verfahren ermittelten Werte stellen das Verhältnis der Zytokinproduktion von IL-5 zu IL-10 nach Bet v 1-Stimulus dar. Statistische Veränderungen ($p < 0,05$) wurden mit Hilfe des zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests ermittelt.

4.3 Auswirkungen der natürlichen Allergenexposition auf Birkenpollenallergiker und gesunde Probanden

Die Birkenpollensaison erstreckt sich je nach den klimatischen Bedingungen über den Zeitraum von Anfang März bis Ende Mai (D'Amato G et al., 2001). Um die immunologischen Veränderungen durch diese natürliche Allergenexposition definieren zu können, wurden zwei Kontrollpopulationen bestehend zum einen aus acht Birkenpollenallergikern, die keine SIT erhielten, und zum anderen aus acht Probanden ohne IgE-vermittelte Allergie in die Studie mit einbezogen.

Die Kontrollpopulation der acht rein symptomatisch therapierten Birkenpollenallergiker wird im folgenden „Allergiker“ genannt, während die Population der acht Probanden ohne IgE-vermittelte Allergie als „Nicht-Allergiker“ bezeichnet wird.

4.3.1 Schweregrad der allergischen Erkrankung unter saisonaler Birkenpollenexposition

Auch in der Kontrollpopulation der Allergiker wurde der Schweregrad der allergischen Symptome subjektiv durch die Einordnung des klinischen Beschwerdebildes auf einer 7-Punkte-Skala erfasst (vgl. 3.2.2). Bei den Allergikern ließ sich allerdings keine signifikante Linderung der Symptome feststellen (Abb. 19). Die klinischen Beschwerden wurden von den acht Probanden in zwei aufeinanderfolgenden Pollenflugzeiten mit „deutlich krank“ beschrieben. Im gleichen Zeitraum zeigte sich bei den immuntherapierten Patienten schon eine tendenzielle Verbesserung des Symptomscores von „deutlich krank“ zu „mäßig krank“, welche sich im weiteren Beobachtungszeitraum signifikant verstärkte (Median m18 = „nur leicht krank“, m30 = „mäßig krank“). Diese Daten stützen die klinische Wirksamkeit der SIT im gesamten Therapieverlauf.

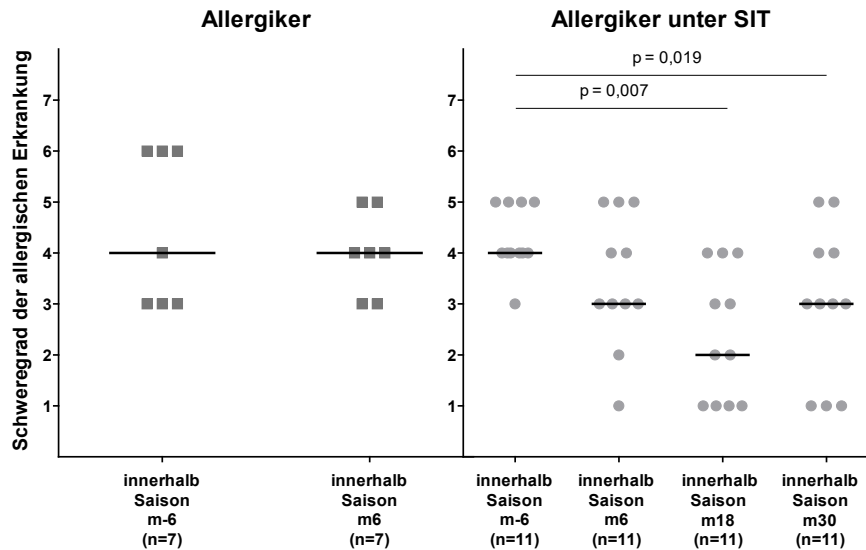


Abb. 19: Klinische Symptomatik unter natürlicher Allergenbelastung

Dargestellt sind die Ergebnisse der subjektiven Einordnung des Schweregrads der allergischen Erkrankung auf einer numerischen Skala von 1 „überhaupt nicht krank“ bis 7 „extrem schwer krank“. Der klinische Symptomscore wurde dazu vergleichend bei rein symptomatisch therapierten Birkenpollenallergikern und bei Patienten, welche mit einer spezifischen Immuntherapie (SIT) behandelt wurden, erfasst. Eine Verbesserung des klinischen Allgemeinbefindens zeigte sich im gesamten Behandlungszeitraum nur bei Allergikern unter SIT. Im Vergleich zur Ausgangspollensaison war dort eine signifikante Reduktion des Schweregrads in der zweiten (m18) und dritten Saison (m30) zu verzeichnen. Statistische Veränderungen ($p < 0,05$) wurden mit Hilfe des zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests ermittelt.

4.3.2 Einfluss der natürlichen Allergenexposition auf die Zytokinproduktion

Neben den klinischen Veränderungen unter natürlicher Allergenbelastung wurden auch Unterschiede hinsichtlich allergenspezifischer Zytokinsekretion untersucht. Für die beiden Kontrollpopulationen (Allergiker und Nicht-Allergiker) wurden dazu jeweils inner- und außerhalb der Saison entnommene PBMC mittels Bet v 1 zur Zytokinproduktion angeregt. Unstimulierte Proben wurden dabei stets zur Kontrolle der unspezifischen Zytokinproduktion mitgeführt. Nach Abnahme der Überstände wurde die Menge der produzierten Zytokine mit dem ELISA-Verfahren quantitativ bestimmt (vgl. 3.4).

Bei Nicht-Allergikern konnte weder inner- noch außerhalb der Saison eine Bet v 1-spezifische IL-5-Sekretion detektiert werden (Abb. 20). Bei der Hälfte der Allergiker induzierte die natürliche Allergenbelastung in der Birkenpollensaison einen IL-5-Anstieg, welcher außerhalb der Saison nicht festgestellt werden konnte. Im Vergleich dazu, wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben, zeigten Birkenpollenallergiker unter SIT zu Therapiebeginn einen tendenziellen Anstieg der IL-5-Sekretion, welcher sich in den folgenden Pollenflugzeiten (m18, m30) kontinuierlich reduzierte.

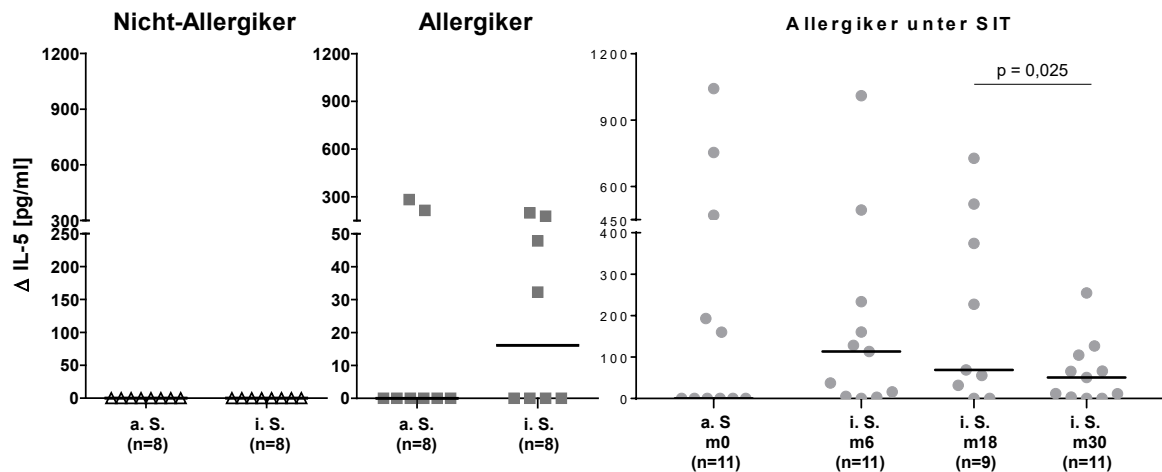


Abb. 20: Einfluss saisonaler Pollenexposition auf die Bet v 1-spezifische Interleukin 5-Konzentration

Dargestellt ist die Interleukin (IL)-5-Freisetzung der untersuchten Gruppen Nicht-Allergiker, Allergiker und Allergiker unter spezifischer Immuntherapie (SIT) zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb (i.S.) und außerhalb der Birkenpollensaison (a.S.). Bei Nicht-Allergikern ließ sich keine IL-5-Sekretion feststellen. Rein symptomatisch behandelte Birkenpollenallergiker zeigten ebenfalls keine signifikanten Veränderungen, jedoch war eine tendenzielle Zunahme der IL-5-Sekretion innerhalb der Saison zu sehen. Diese Zunahme in der Birkenpollensaison (m6, m18, m30) ließ sich auch bei Allergikern unter SIT dokumentieren. Allerdings konnte im weiteren Therapieverlauf eine sukzessive Verringerung der IL-5-Anstiege beobachtet werden. Die mit dem ELISA-Verfahren ermittelten Werte stellen die Zytokinproduktion auf Bet v 1-Stimulus dar. Statistische Veränderungen ($p < 0,05$) wurden mit Hilfe des zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests ermittelt.

Eine Beeinflussung der IFN γ -Produktion durch die natürliche Allergenexposition konnte weder bei Nicht-Allergikern noch bei symptomatisch behandelten Allergikern festgestellt werden (Abb. 21). Wie bereits beschrieben (vgl. 4.2.2, Abb. 11), waren unter SIT signifikante Abnahmen bei m3 und m30 zu detektieren.

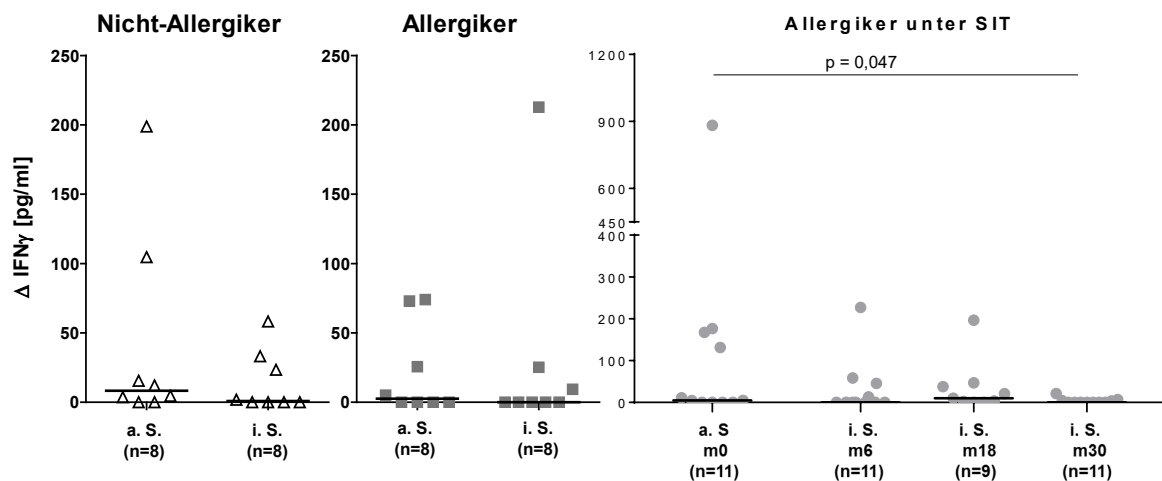


Abb. 21: Einfluss saisonaler Pollenexposition auf die Bet v 1-spezifische Interferon γ -Sekretion

Abgebildet sind die durch natürliche Allergenexposition hervorgerufenen Veränderungen in der Bet v 1-spezifischen Interferon (IFN) γ -Produktion außerhalb (a.S.) und innerhalb der Saison (i.S.) bei gesunden Probanden (Nicht-Allergiker) und bei Birkenpollenallergikern ohne spezifische Immuntherapie (SIT). Zum Vergleich sind ebenfalls die Werte der SIT-behandelten Patienten aufgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede waren innerhalb der Allergiker-Gruppe unter SIT festzustellen. Die mit dem ELISA-Verfahren ermittelten Werte stellen die Zytokinproduktion auf Bet v 1-Stimulus dar. Statistische Veränderungen ($p < 0,05$) wurden mit Hilfe des zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests ermittelt.

Im Gegensatz zu den vorherigen Ergebnissen war die IL-10-Sekretion der Nicht-Allergiker außerhalb der Saison tendenziell höher als innerhalb der Saison (Abb. 22). Die Werte für Allergiker hingegen wiesen in und außerhalb der Saison nahezu keine Unterschiede auf. Auch die durch die SIT hyposensibilisierten Patienten zeigten keine extremen Veränderungen der IL-10-Produktion (vgl. Kapitel 4.2.2). Im Vergleich zum Ausgangswert bei m0 stieg die Zytokinkonzentration leicht an und erreichte bei m6 ihren Maximalwert. Im weiteren Verlauf der Immuntherapie war ein tendenzieller Abfall der innersaisonalen (m6, m18, m30) Werte ersichtlich. Eine Annäherung an das Ausgangsniveau bei m0 ließ sich zum Ende der Behandlung erkennen.

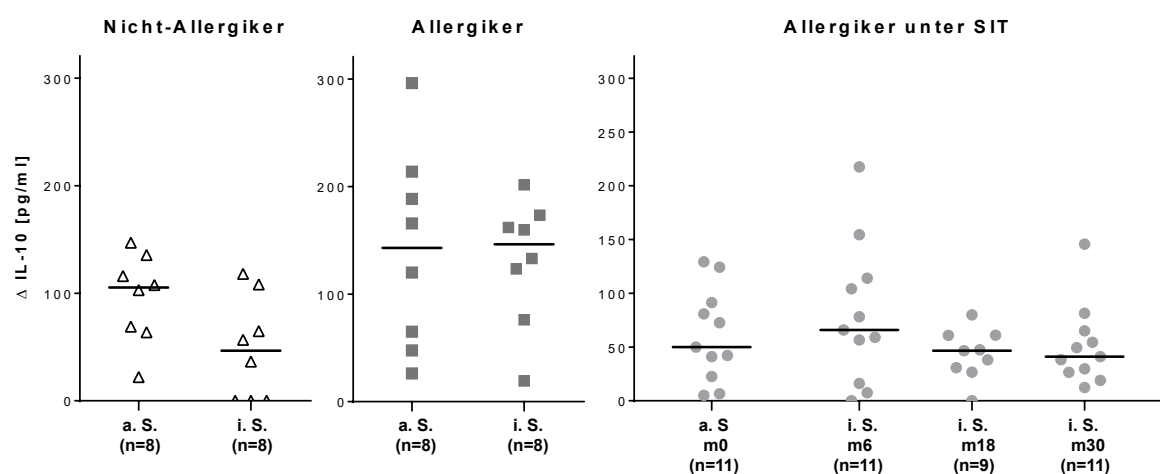


Abb. 22: Einfluss saisonaler Pollenexposition auf die Bet v 1-spezifische Interleukin 10-Produktion

Dargestellt ist die auf Bet v 1-Stimulation produzierte Interleukin (IL)-10-Menge außerhalb (a.S.) und innerhalb der Saison (i.S.) bei Probanden ohne Ausprägung einer IgE-vermittelten Allergie (Nicht-Allergiker), rein symptomatisch therapierten Birkenpollenallergikern und bei Patienten, die eine spezifische Immuntherapie (SIT) erhalten haben. Hierbei fällt bei Nicht-Allergikern eine erhöhte IL-10-Freisetzung außerhalb der Birkenpollensaison auf. Allergiker zeigten hingegen durch ihre gleichbleibenden Werte keine Beeinflussung durch den saisonalen Pollenflug. Bei Allergikern unter SIT war ein tendenzieller Anstieg der IL-10-Sekretion in der ersten Saison (m6), welcher im Verlauf der Immuntherapie abschwächte, zu detektieren. Die mit dem ELISA-Verfahren ermittelten Werte stellen die Zytokinproduktion auf Bet v 1-Stimulus dar.

Wie auch bei den SIT-behandelten Probanden wurde in beiden Kontrollpopulationen ebenfalls die TGF- β -Produktion an Tag drei und an Tag sieben gemessen. Dabei ließ sich in der Gruppe der Nicht-Allergiker keine allergenspezifische TGF- β -Sekretion detektieren. Unter den Allergikern gab es lediglich zwei der acht Probanden, die außer- und innerhalb der Birkenpollensaison eine messbare TGF- β -Freisetzung zeigten (Daten nicht gezeigt). Eine statistische Relevanz konnten die gewonnenen Messdaten jedoch nicht erreichen.

4.3.3 Proportionale Veränderungen der Zytokinfrequenz unter natürlicher Allergenexposition

Untersuchungen des IL-5/IFN γ -Verhältnisses zeigten in den beiden Kontrollpopulationen keine signifikanten Unterschiede der inner- und außerhalb der Birkenpollensaison erhobenen Daten (Abb. 23). Der Quotient aus IL-5 und IFN γ war bei Nicht-Allergikern innerhalb (Median 0,77) und außerhalb (Median 0,15) der Pollenflugzeit IFN γ geprägt. Allergiker, die ausschließlich mit symptomatisch wirkenden Medikamenten behandelt wurden, zeigten keine Unterschiede zwischen saisonalen und nicht-saisonalen Werten. Bei Allergikern unter SIT entsprach der Ausgangswert m0 vor Beginn der Therapie in etwa dem Wert der Pollenallergiker ohne Kausaltherapie. Bei Einbeziehung des Medians war das IL-5/IFN γ -Verhältnis zu Beginn der Therapie ausgeglichen. Innerhalb der Saison nahm der Quotient von IL-5 und IFN γ dann zu, wobei dieser Anstieg zwischen m0 und m30 signifikant war ($p = 0,01$) und insgesamt für ein eher IL-5 dominiertes Verhältnis sprach.

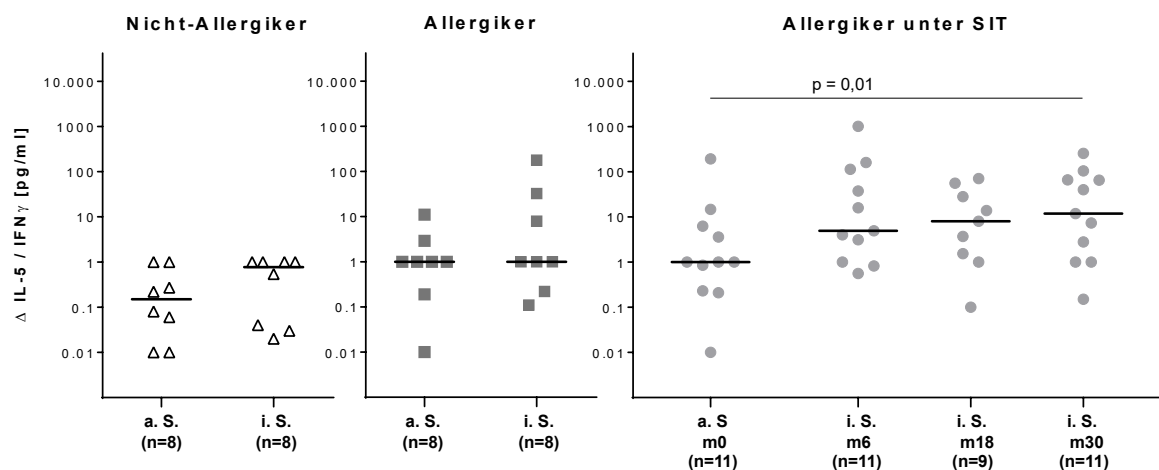


Abb. 23: Auswirkungen der natürlichen Allergenexposition auf das Verhältnis von Interleukin 5 zu Interferon γ

Vergleichend abgebildet ist der Quotient aus der Interleukin (IL)-5- und Interferon (IFN) γ -Produktion unter dem Einfluss der saisonalen Pollenexposition auf Nicht-Allergiker, Birkenpollenallergiker mit rein symptomatischer Therapie und Allergiker, die mit einer spezifischen Immuntherapie (SIT) behandelt wurden. Die Datenerhebung erfolgte dabei außerhalb (a.S.) und innerhalb der Saison (i.S.). Statistisch relevante Veränderungen waren nur bei SIT therapierten Allergikern festzustellen. Die mit dem ELISA-Verfahren ermittelten Werte stellen die Zytokinproduktion nach Bet v 1-Stimulus dar. Statistische Veränderungen ($p < 0,05$) wurden mit Hilfe des zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests ermittelt.

Der Einfluss der natürlichen Allergenexposition auf den IL-5/IL-10-Quotienten (Abb. 24) von nicht-allergischen Probanden und Allergikern ohne SIT zeigte im Vergleich von inner- und außerhalb der Saison gelegenen Zeitpunkten keine Unterschiede. Im Gegensatz dazu konnte ein SIT-vermittelter Einfluss auf das Verhältnis zwischen IL-5 und IL-10 festgestellt werden. Bei hyposensibilisierten Probanden unter Immuntherapie ließ sich in der Saison des ersten Jahres ein tendenziell IL-5-geprägter IL-5/IL-10-Quotient feststellen. Unter dem Einfluss der SIT reduzierte sich dieser Quotient zu Zeitpunkten saisonalen Pollenflugs kontinuierlich und resultierte in der dritten Pollenflugzeit in einer IL-10-Dominanz (Median m30 = 0,72) verbunden mit einer verminderten IL-5-Antwort. Diese Veränderung des Zytokinverhältnisses zeigte sich auch in einer signifikanten Reduktion ($p = 0,021$) von m18 zu m30.

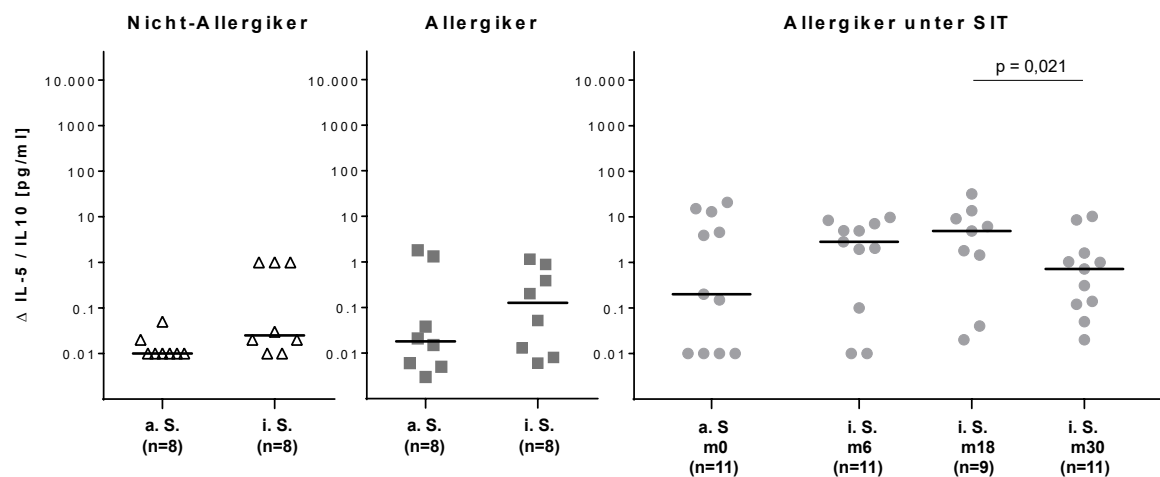


Abb. 24: Einfluss der natürlichen Allergenexposition auf das Verhältnis von Interleukin 5 zu Interleukin 10

Dargestellt sind die Auswirkungen der Pollenexposition auf das Verhältnis zwischen Bet v 1-spezifisch produziertem Interleukin (IL)-5 und IL-10 von gesunden Probanden (Nicht-Allergikern), rein symptomatisch therapierten Allergikern und Patienten, die mit einer spezifischen Immuntherapie (SIT) behandelt wurden. Eine signifikante Veränderung des IL-5/IL-10-Verhältnisses im Vergleich der außerhalb (a.S.) und innerhalb der Birkenpollensaison (i.S.) ermittelten Werte konnte ausschließlich bei Allergikern unter SIT nachgewiesen werden. Dabei zeigte die Gegenüberstellung der saisonalen (m6, m18, m30) Werte eine signifikante Reduktion von m18 zur nachfolgenden Pollenflugzeit (m30). Die mit dem ELISA-Verfahren ermittelten Werte stellen die Zytokinproduktion nach Bet v 1-Stimulus dar. Statistische Veränderungen ($p < 0,05$) wurden mit Hilfe des zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests ermittelt.

5 Diskussion

In der vorliegenden longitudinalen Studie wurde die durch die SIT induzierte zelluläre Immunmodulation auf Zytokin-Ebene bei Birkenpollenallergikern untersucht. Dafür wurde der klinische Behandlungsverlauf zum einen mittels allergologischer Testverfahren und zum anderen durch die Erhebung des individuellen Beschwerdescores beurteilt. Änderungen in der Zytokinproduktion von IL-5, IFN γ , IL-10 und TGF- β durch PBMC wurden zu den entscheidenden Zeitpunkten (Aufdosierungs- und Erhaltungsphase) der SIT sowohl inner- als auch außerhalb der Birkenpollensaison detektiert. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Studie lag in der vergleichenden Erhebung immunologischer Veränderungen unter natürlicher Allergenexposition. Diese Untersuchungen wurden mit ausschließlich symptomatisch therapierten Birkenpollenallergikern und mit gesunden Probanden ohne Manifestation einer IgE-vermittelten Allergie durchgeführt. Zusammen mit den Ergebnissen der SIT-Patienten konnten die erhobenen immunologischen Parameter einer therapeutischen Allergenexposition durch die SIT oder einer natürlichen Allergenexposition durch den Pollenflug zugeordnet werden.

Hervorzuheben ist an dieser Studie besonders der Langzeitaspekt der Untersuchungen über den Verlauf einer dreijährigen SIT (nach der aktuellen Leitlinie zur SIT bei IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen sollte bei Atemwegsallergien die Behandlungsdauer mindestens drei Jahre betragen) (Pfaar et al., 2014). Im Vergleich zu anderen Studien mit kürzeren Therapie- bzw. Untersuchungszeiträumen (Bohle et al., 2007 (ein Jahr); Francis et al., 2008 (ein Jahr); Savolainen et al., 2004 (ein Jahr)) ließen sich damit besonders Veränderungen zwischen einer Birkenpollensaison und den folgenden innersaisonalen Zeitpunkten über den gesamten Behandlungszeitraum erfassen.

Auch die detaillierte Verlaufskontrolle mit monatlichen bis halbjährlichen Blutabnahmen ist ein besonderes Merkmal. Sie ermöglichte eine engmaschige Überprüfung der durch die SIT induzierten Veränderungen. Das Studienprotokoll wurde dazu an die entscheidenden Zeitpunkte der SIT (Aufdosierungs- und Erhaltungsphase, innerhalb und außerhalb der Saison) angepasst. Das Protokoll der meisten anderen Studien sah dafür weit weniger Kontrollpunkte vor, beispielsweise nur in der Frühphase der SIT (Akdis et al., 1998; Movérare et al., 2000a), oder war weniger engmaschig angelegt mit Untersuchungszeitpunkten lediglich vor der Therapie und nach Abschluss der Behandlung (Bohle et al., 2007; Francis et al., 2008).

Diese Unterschiede im Studienaufbau müssen beim Vergleich der Daten und der teilweise konträren Befunde der verschiedenen Studien berücksichtigt werden.

Die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit ließen bereits nach einem Jahr eine dauerhaft signifikant verminderte allergische Hautreaktion auf BPA erkennen. Zusätzlich gaben die Probanden ab der zweiten Birkenpollensaison unter Therapie eine deutliche subjektive Verbesserung der Beschwerden an.

Zellulär zeigte sich eine kurzzeitige Zunahme der allergenspezifischen IL-10-Expression in der ersten Pollenflugzeit und eine signifikante Abnahme des für Birkenpollenallergiker typischen saisonalen Anstiegs des allergieassoziierten Th2-Zytokins IL-5 im dritten Behandlungsjahr. Durch den verminderten Einfluss der Th2-Zytokine ergab sich eine saisonal signifikante Reduktion des IL-5/IL-10-Quotienten im dritten Behandlungsjahr. Eine Veränderung des Th2/Th1-Zell-Verhältnisses zu einem Th1-Zell-mediierten Gleichgewicht konnte hingegen nicht dokumentiert werden, da die IFN γ -Produktion unter Therapie nahezu unverändert blieb. Die vorliegenden Ergebnisse veranschaulichen die zeitliche Dynamik der unterschiedlichen zellulären Komponenten in der Etablierung einer SIT-induzierten Allergentoleranz mit Induktion und Repression einzelner Zytokine zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

5.1 Reevaluation des Studienprotokolls

Zur Ermittlung der optimalen Stimulationsdauer für diese Studie wurden zunächst PBMC-Proben von insgesamt 14 SIT-behandelten Patienten, Allergikern und Probanden ohne allergische Erkrankung vom Sofort-Typ mit dem Hauptallergen der Birkenpollen, Bet v 1, zur spezifischen Zytokinsekretion angeregt. Die Überstände wurden nach drei, fünf und sieben Tagen abgenommen und die Bet v 1-spezifische Zytokinsekretion mit dem ELISA-Verfahren untersucht und anschließend ausgewertet. Im Studienprotokoll dieser Arbeit wurde die Stimulationsdauer für IL-5 und IFN γ auf sieben Tage, für IL-10 auf drei Tage und für TGF- β sowohl auf drei als auch auf sieben Tage festgelegt.

In der Literatur gibt es variable Angaben zum Stimulationsablauf. Movérare et al. verwendeten zur Detektion des Zytokins IL-5 unter BPA-Immuntherapie ebenfalls eine Stimulationsdauer von sieben Tagen. Anschließend erfolgte allerdings eine Restimulation mit den Mitogenen Phytohämagglutinin (PHA) und Phorbol 12-Myristate-13-Acetate (PMA) für weitere 24h. Die Bestimmung der IL-10-Sekretion erfolgte nach dem gleichen Protokoll (Movérare et al., 2000b). Auch wurden für IL-10- und TGF- β -Messungen durch das ELISA-Verfahren bei Birkenpollenallergikern unter SIT Überstände nach sechs Tagen abgenommen (Bohle et al., 2007). Francis et al. wählten in zwei Studien zur Gräserpollen-SIT für die Detektion der Zytokine IL-5, IFN γ ,

IL-10 und TGF- β ebenfalls eine sechstägige Stimulationsdauer (Francis et al., 2003; Francis et al., 2008). In einer Studie von Eifan et al. wurden dagegen die Überstände bei immuntherapierten Hausstauballergikern zur Detektion der Zytokine IL-5, IFN γ , IL-10 und TGF- β bereits nach fünf Tagen abgenommen (Eifan et al., 2010).

Diese Zeitabstände entsprechen in etwa der hier für IL-5 und IFN γ evaluierten Stimulationsdauer von sieben Tagen. Die Abweichungen bezüglich des optimalen Zeitpunkts für die Überstandabnahme bei IL-10 (diese Studie: drei Tage, angeführte Literatur: fünf bzw. sechs bzw. sieben Tage) könnten durch die Verwendung verschiedener Allergene (BPA versus Gräserpollenallergen versus Hausstaubmilbenallergene) oder durch Unterschiede in der Vorbehandlung (mit/ohne Mitogene) bedingt sein.

Die TGF- β -Sekretion wurde nach einer Stimulationsdauer von drei und sieben Tagen evaluiert und deckt somit ein breiteres zeitliches Fenster ab.

Die angeführte Literatur zeigt, dass in den meisten Arbeiten lediglich ein Zeitpunkt zur Abnahme aller Zytokine gewählt wurde. Das in dieser Studie gewählte Protokoll mit - je nach Zytokin - zwei unterschiedlichen Abnahmezeitpunkten wurde auf die optimale Stimulationsdauer der einzelnen Zytokine abgestimmt. Damit wurde eine engmaschigere Detektion der spezifischen Zytokinsekretion ermöglicht.

5.2 Bewertung des ELISA-Verfahrens

Die ELISA-Methode dient dem Nachweis von Zytokinen, gebundenen Antigenen oder Antikörpern. Dabei wird mithilfe eines gekoppelten Enzyms, das eine farblose Substanz in ein farbiges Produkt umwandelt, die Menge des detektierten Antigens bzw. Antikörpers indirekt bestimmt (vgl. 3.4). Auch speziell in der Erforschung immunologischer Veränderungen unter SIT findet dieses Verfahren standardmäßig Anwendung und ist gut etabliert (Akdis et al., 1996; Bohle et al., 2007; Eifan et al., 2010; Francis et al., 2008).

Alternative Verfahren zur der hier erfolgten Quantifizierung der Zytokinmenge mittels ELISA sind die *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR), der enzymgekoppelte Immunospottest (*enzyme-linked immunospot assay*; ELISPOT-Assay) oder die Multiparameter-Durchflusszytometrie. Bei der ELISPOT-Methode wird die Frequenz an zytokinproduzierenden Zellen und die Intensität der Freisetzung bestimmt. Bei der PCR erfolgt eine Messung auf mRNA Ebene und mit der Durchflusszytometrie ist beispielsweise der Nachweis intrazellulärer Zytokine möglich (Clay et al., 2001; Möbs and Schmidt, 2016). Alle Verfahren lassen sich zur direkten

oder indirekten Zytokindetektion nutzen, betrachten jedoch unterschiedliche Aspekte. Sie stehen an verschiedenen Kontrollpunkten der Zytokinproduktion durch T-Zellen: mRNA Transkription, intrazelluläre Speicherung, Sekretion auf individuellem Zelllevel und freies Zytokin.

Eine vergleichende Untersuchung der oben genannten Verfahren wurde von Tassignon et al. durchgeführt (Tassignon et al., 2005). Dabei wurde peripheres Blut gesunder Probanden mit Tetanus-Toxoid versetzt und die IFN γ -Zytokinantwort vor und nach der Impfung gemessen. Mit einer Sensitivität von 57% vor der Impfung und 43% nach der Impfung lag das ELISA-Verfahren im „guten Mittelfeld“. Die höchste Sensitivität wurde vor der Tetanus-Toxoid-Impfung mittels ELISPOT (93%) erzielt und nach der Impfung mit der Durchflusszytometrie (79%) festgestellt. Insgesamt wurde aber die ELISA-Methode mit ihren durchschnittlichen Ergebnissen zu beiden Messzeitpunkten als gute Alternative erachtet, welche zudem einfach und kostengünstig in jedem Labor durchführbar ist.

In einer weiteren Arbeit wurden ELISA- und ELISPOT-Ergebnisse bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber einer Th2-Zytokinantwort auf Nickel oder Tetanus-Toxoid untersucht (Minang et al., 2008). Hierfür wurden Nickel-Allergiker und Nicht-Allergiker in die Studie inkludiert. Als Schwachpunkt des ELISA-Verfahrens wurde das vergleichsweise hohe Detektionslimit erachtet. So kann eine niedrige Frequenz allergenspezifischer T-Zellen zu Zytokinsekretionen unterhalb der Detektionsgrenze des Tests führen und damit unentdeckt bleiben (Ekerfelt et al., 2002; Tanguay and Killian, 1994). Die ELISPOT-Methode zeichnet sich hingegen durch eine hohe Sensitivität in der Detektion durch Messung auf Einzelzellniveau aus und kann damit einige der Nachteile des ELISA-Verfahrens ausgleichen. Trotz dieser möglichen Vorteile findet sie im Allergiebereich in relativ wenigen Studien Anwendung zur Th2-Zytokindetektion (Minang et al., 2008).

Zusammenfassend betrachtet ist die niedrigere Sensitivität des ELISA-Verfahrens ein Nachteil, welcher auch eine mögliche Erklärung für die nicht detektierbare TGF- β -Antwort sein könnte. Durch die breite Anwendung des ELISA-Verfahrens im Rahmen dieser Studie konnten jedoch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erhöht und methodische Differenzen zu anderen Studien minimiert werden. Darüber hinaus lag der Schwerpunkt dieser Arbeit in der quantitativen Zytokinmessung, da somit die tatsächlich vorhandene allergenspezifische Zytokinmenge nach Sekretion durch die Gesamtheit der PBMC betrachtet werden und zusätzlich, neben T-Zellen, auf eine potentielle unspezifische Produktion durch andere Zell-Typen geprüft werden konnte.

5.3 Einfluss der spezifischen Immuntherapie auf die Immunantwort bei Typ-I-Allergien

Die SIT stellt eine kausale Therapie zur Behandlung IgE-vermittelter Allergien dar. Lange Zeit war ihre Wirksamkeit nur klinisch belegt. In den letzten Jahrzehnten wurde der therapeutische Effekt in vielen randomisierten, doppelblinden, placebokontrollierten Studien bestätigt und auch durch immunologische, d.h. zelluläre und humorale, Veränderungen in zunehmendem Maße experimentell belegt (Bødtger et al., 2002; Grammer et al., 1982; Jutel et al., 2005; Pfaar et al., 2016; Rondón et al., 2016; Walker et al., 1995).

Da IgE-vermittelte Allergien durch eine Th2-Zellimmunantwort charakterisiert sind, wurde zunächst ein Wechsel von allergenspezifischen Th2-Zellen zu einer Th1-Zell-Antwort als Ursache für die verbesserte klinische Symptomatik nach einer SIT angenommen (Durham et al., 1991; Jutel et al., 1995). Neuere Daten legen den hemmenden Effekt der Treg-Zellen auf Teff-Zellen als eine wesentliche Ursache für die Toleranzinduktion bei Allergikern nahe (Akdis et al., 2004; Möbs et al., 2010). Auch könnte eine Deletion allergenspezifischer Th2-Zellen nach wiederholter, hochdosierter Allergenstimulation eine Rolle zu spielen (Wambre et al., 2014).

Zusätzlich zu den Änderungen auf zellulärer Ebene scheinen auch humorale Faktoren eine entscheidende Position in der Toleranzinduktion einzunehmen. So wird angenommen, dass allergenspezifische IgG-Antikörper ebenfalls eine inhibierende Wirkung auf eine überschießende Immunantwort haben. Sie können Allergene fixieren und dadurch deren Bindung an IgE blockieren und so die IgE-vermittelte Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus Mastzellen und Basophilen unterdrücken und die IgE-gebundene Allergenpräsentation für T-Zellen verhindern (Flicker and Valenta, 2003; Wachholz and Durham, 2004; Zeng et al., 2016).

5.3.1 Einfluss der spezifischen Immuntherapie auf die klinische Symptomatik

Die klinische Wirksamkeit der SIT wurde in dieser Studie anhand der Daten aus Pricktest und Symptomscore bewertet. Bereits nach sechs Monaten Therapiedauer wurde eine tendenzielle Verbesserung der klinischen Beschwerden angegeben, welche sich im weiteren Beobachtungszeitraum signifikant verstärkte und über die gesamte Behandlungsdauer erhalten blieb. Auch die objektiven Daten des Pricktests konnten die gute klinische Wirksamkeit der SIT durch eine konstant deutliche Reduktion der Hautreaktion auf BPA bestätigen. Der Vergleich mit den klinischen Therapiewerten der rein symptomatisch therapierten Allergiker zeigte, dass die

Verminderung der klinischen Beschwerden auf SIT-induzierte Modulationen zurückzuführen war, da bei Probanden ohne SIT keine Verminderung des Schweregrads der allergischen Erkrankung in zwei aufeinander folgenden Birkenpollenflugzeiten festzustellen war.

Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen die Resultate anderer Studien zur SIT mit Pollenallergenen (Drachenberg et al., 2001; Höiby et al., 2010; Möller et al., 2002). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Remission der Symptome auch über drei Jahre nach Therapie erhalten blieb (Des Roches et al., 1996; Durham et al., 1999; Eng et al., 2006; Hui et al., 2014).

5.3.2 Veränderung der zellulären Zytokinproduktion unter spezifischer Immuntherapie

5.3.2.1 Unspezifische Zytokinproduktion

Der Einfluss der SIT auf den zellulären Anteil des Immunsystems wurde anhand von Bet v 1-stimulierten Proben und unstimulierten Kontrollproben untersucht. Das in der unstimulierten Probe vorhandene Zytokin beschreibt die unspezifische Zytokinproduktion, so dass die Differenz der Zytokinmengen in stimulierter und unstimulierter Probe den Anteil der Bet v 1-spezifischen Zytokinproduktion ergibt.

Eine unspezifische IL-5-Produktion (vgl. 4.2.3) konnte nur sehr vereinzelt festgestellt werden. Dieses Ergebnis spricht für eine entscheidende Rolle von IL-5 bei der Entwicklung einer Th2-Zell-vermittelten allergischen Reaktion, da nur in den allergenstimulierten Proben eine für die allergische Immunantwort charakteristische Bet v 1-spezifische IL-5-Sekretion vorhanden war (siehe 5.3.2.2) (Romagnani, 1994). Das in einigen sehr wenigen Fällen unspezifisch sezernierte IL-5 könnte aus dem natürlichen Kontakt mit Allergenen resultieren. Außerhalb der Birkenpollenflugsaison könnte ein Kontakt mit kreuzreaktiven Allergenen, wie dem Apfelallergen Mal d 1, für die IL-5-Produktion verantwortlich sein (Vanek-Krebitz et al., 1995).

Bei der Analyse der IFN γ -Daten konnte hingegen eine zum Teil verstärkte Zytokinproduktion ohne Bet v 1-Stimulus festgestellt werden. Da IFN γ eine bedeutende antivirale und antibakterielle Wirkung hat, sind erhöhte Werte im peripheren Blut oft im Zusammenhang mit mikrobiellen Kontakten zu finden und deshalb möglicherweise auch zum Teil in der unstimulierten Probe vorhanden (Romagnani, 1991).

Eine unspezifische IL-10-Sekretion konnte ebenfalls nachgewiesen werden, jedoch hatte diese einen weitaus geringeren Anteil an der Gesamt-IL-10-Produktion als bei

IFN γ . Denkbar wäre, dass durch den Kontakt mit natürlichen Antigenen Abwehrreaktionen initiiert worden waren, bei denen die immunsupprimierende Wirkung von IL-10 wichtig war (Akdis et al., 1998; Akdis et al., 2001). Dies könnte die IL-10-Sekretion in der unstimulierten Probe begründen.

5.3.2.2 Bet v 1-spezifische Zytokinproduktion unter spezifischer Immuntherapie

Neben der Erhebung der klinischen Parameter (Pricktest, Symptomscore) wurde in dieser Studie das Profil der Zytokine IL-5, IFN γ , IL-10 und TGF- β analysiert. IL-5 ist entscheidend an der Th2-Zell-vermittelten allergischen Immunantwort beteiligt, da es u.a. Eosinophile aktiviert und zur Freisetzung inflammatorischer Substanzen (basische Proteine, reaktive Sauerstoffspezies) führt (Sanderson, 1992). IFN γ wirkt als Th1-Zytokin einer Th2-Zell-Antwort entgegen und induziert den Wechsel zu IgG. Zusätzlich unterdrückt es die IgE-Bildung (Mullen et al., 2001; Venkataraman et al., 1999). IL-10 und TGF- β wirken immunsuppressiv. Sie besitzen das Potential, die Proliferation und Zytokinproduktion von Th2- und Th1-Zellen zu unterdrücken (Roncarolo et al., 2006). Somit können diese vier Zytokine richtungsweisend an den entscheidenden Zeitpunkten der Entwicklung oder Unterdrückung einer überschießenden allergischen Immunantwort beteiligt sein.

Eine Messung der Bet v 1-spezifischen Zytokinproduktion durch periphere Blutzellen *in vitro* sollte Aufschluss über die Veränderungen des Zytokinprofils bei nicht therapierten Allergikern, bei Probanden ohne Manifestation einer IgE-vermittelten Allergie sowie bei birkenpollenallergischen Patienten unter dem Einfluss der Immuntherapie geben.

5.3.2.2.1. IL-5

In der vorliegenden Studie zeigte die IL-5-Produktion neben einer diskreten Zunahme zum Ende der Aufdosierungsphase einen tendenziellen Anstieg in der ersten Birkenpollensaison, dessen Ausprägung sich in den folgenden Pollenflugzeiten kontinuierlich reduzierte, was sich in einer signifikanten Abnahme der IL-5-Sekretion von der zweiten zur dritten Saison dokumentieren ließ.

Die anfängliche Erhöhung der IL-5-Konzentration war am ehesten durch repetitive Allergengaben in der Aufdosierungsphase und durch die zusätzliche Allergenbelastung während der Pollenflugzeit bedingt (Benjaponpitak et al., 1999; Benson et al., 2000). Eine Zunahme der IL-5-Konzentration bzw. ein Th2-dominiertes Immuntyp in der Frühphase der SIT bei Birkenpollenallergikern wurde auch von anderen Untersuchern

festgestellt (Benjaponpitak et al., 1999; Möbs et al., 2012; Movérare et al., 2000a; Movérare et al., 1998). Da niedrige Allergendosen zu einer Th2-Zell-Immunantwort führen können, während höhere Dosen im Zusammenhang mit einer Immunantwort vom Th1-Zell-Typ zu stehen scheinen (Kolbe et al., 1991; Secrist et al., 1995), könnte die niedrige BPA-Menge in der Frühphase der SIT einen Anstieg der IL-5-Sekretion, wie in dieser und anderen Studien beobachtet, bedingen. Eine weitere Ursache ist vermutlich die kumulative Dosissteigerung unter SCIT (Benjaponpitak et al., 1999; Movérare et al., 1998).

Jedoch wurde in einzelnen Studien auch eine Abnahme der IL-5-Produktion bzw. der Th2-Zell-assoziierten Zytokine in der frühen Phase der SIT nachgewiesen (Bohle et al., 2007). Jutel et al. konnten beispielsweise schon nach 70 Tagen eine Reduktion der IL-5-Antwort bei Hausstauballergikern unter SIT sehen (Jutel et al., 2003). Besonders in Studien zur Bienengift-SIT wurde vermehrt eine IL-5-Reduktion festgestellt (Akdis et al., 1996; Akdis et al., 1998; Müller et al., 1998). Beim Bienengift handelt es sich allerdings um ein Allergen, welches eine systemische Immunantwort auslösen kann. Im Gegensatz dazu rufen die saisonalen Pollenallergene lokalisierte allergische Reaktionen der Atemwege hervor. Typischerweise erfolgt die Aufdosierung in der Bienengift-SIT innerhalb von Tagen oder einigen Wochen, wohingegen die konventionelle Immuntherapie mit Aeroallergenen eine Einleitungsphase von einigen Monaten vorsieht (Secrist et al., 1993). Folglich übersteigt die kumulative Allergenmenge bei der Bienengift-SIT besonders in der Anfangszeit die Menge an konventionell verabreichtem Allergen (Akdis et al., 1998).

Aufgrund der beschriebenen Differenzen können Ergebnisse aus Bienengift-SIT und Pollen-SIT daher nur bedingt miteinander verglichen werden.

Mit dem Fortschreiten der SIT konnte eine sukzessive Abnahme des saisonalen IL-5-Anstiegs in der zweiten und dritten Saison dokumentiert werden. Zeitgleich konnte eine deutliche Verbesserung der klinischen Symptome festgestellt werden, was im Einklang mit der wichtigen Rolle von IL-5 in der allergischen Erkrankung steht (Corrigan and Kay, 1992). Eine hochdosierte Allergenbelastung, ähnlich der in der Erhaltungsphase der SIT applizierten Dosis, kann eine T-Zellanergie mit anschließender Apoptose zur Folge haben (Vandenbark et al., 2000). *In vitro* Untersuchungen konnten in diesem Zusammenhang eine erhöhte Apoptoserate der IL-4⁺ T-Zellen und T-Zell-Anergie nach Stimulation von humanen T-Zellen mit hohen Dosen von Hausstaubmilbenextrakt nachweisen (Gardner et al., 2004). Die prinzipiell reversible T-Zellanergie infolge Applikation hoher Allergendosen wurde in mehreren Studien als möglicher Wirkmechanismus der SIT diskutiert (Akdis et al., 1996; Schwartz, 2003; Till et al.,

1997). Somit könnte die zunehmende Reduktion der saisonalen IL-5-Anstiege ohne Verschiebung zu einer IFN γ -dominierten Immunantwort in der Erhaltungsphase durch eine SIT-vermittelte Anergieinduktion allergenspezifischer Th2-Zellen zu erklären sein. Auch eine von Bohle et al. beschriebene klonale Deletion allergenspezifischer Th2-Zellen ist als mögliche Ursache für die beobachtete Reduktion des IL-5-Anstiegs denkbar (Bohle et al., 2007). Darüber hinaus kann auch eine Depletion terminal differenzierter allergenspezifischer Th2-Zellen Einfluss auf die IL-5-Sekretion unter SIT haben und damit zur Toleranzentwicklung beitragen (Wambre et al., 2012; Wambre et al., 2014).

5.3.2.2.2 IFN γ

Das Th1-Zytokin IFN γ hat viele Eigenschaften, die einer überschießenden Th2-Immunantwort entgegenwirken können. IFN γ inhibiert die Zelldifferenzierung und Rekrutierung der Th2-Zellen (Elser et al., 2002) und fördert die Differenzierung naiver T-Zellen zu einem Th1-Zell-Phänotyp (Mullen et al., 2001; Szabo et al., 2003). Zusätzlich vermindert es die IgE-Produktion durch Hemmung der IL-4-induzierten Expression des ϵ -Transkripts und unterstützt die Suppression der Th2-Zytokinausschüttung (Venkataraman et al., 1999). Zusammengenommen haben diese Funktionen eine antagonistische Wirkung auf Th2-Zellen und -Zytokine und können folglich auch eine wichtige Rolle bei der Immuntherapie spielen.

Doch konnte für IFN γ in dieser Studie nur eine tendenziell gesteigerte Produktion nach einjähriger Therapie festgestellt werden. Eine deutliche Abnahme ließ sich hingegen verglichen mit dem Ausgangswert vor Therapie zum Ende der Einleitungsphase und in der dritten Saison dokumentieren. Bei nichttherapierten Allergikern und gesunden Probanden konnten keine Unterschiede zwischen inner- und außersaisonalen Werten detektiert werden.

Ähnlich den hier vorliegenden Daten fand sich auch bei Bohle et al. zunächst eine nach vier Wochen Immuntherapie reduzierte IFN γ -mRNA-Expression. 52 Wochen nach Therapiebeginn zeigte sich dagegen ein erhöhtes IFN γ -mRNA-Level (Bohle et al., 2007). Ein Anstieg der IFN γ^+ T-Zellen ließ sich auch bei Graspollen-Allergikern nach einjähriger SIT und bei Bienengift-Allergikern unter SIT dokumentieren (Ebner et al., 1997; Jutel et al., 1995).

Im Gegensatz dazu wurde bei Hausstauballergikern unter SIT eine verringerte allergenspezifische IFN γ -mRNA-Expression festgestellt (O'Brien et al., 1997). Gegen einen ausgeprägten Einfluss von Th1-Zellen und IFN γ als SIT-induzierte Immunmodulation spricht zudem eine von Hansen et al dokumentierte Verstärkung

allergischer und asthmatischer Erkrankungen durch Th1-Zell-assoziierte Entzündungsreaktionen (Hansen et al., 1999).

Ursache für die teilweise konträren Ergebnisse können Unterschiede bezüglich des verursachenden Allergens (Graspollen, Bienengift) und bezüglich des zugrunde liegenden Studienprotokolls (Messung nach einem Monat bzw. Messung nach vier und 52 Wochen) sein.

Die wenig ausgeprägten Schwankungen und der deutliche Abfall der IFN γ -Konzentration in dieser Studie könnten allerdings auch auf eine eher lokale Immunreaktion mit einem Wechsel IFN γ -produzierender Zellen an den Ort des Allergenkontakts hinweisen. So konnten in verschiedenen Studien keine Veränderungen des IFN γ -Spiegels im peripheren Blut nachgewiesen werden (Movérare et al., 1998; Söderlund et al., 1997), während in Gewebeproben der Nasenschleimhaut 24h nach nasaler Allergenapplikation erhöhte IFN γ -produzierende T-Zellzahlen zu finden waren (Durham et al., 1996).

5.3.2.2.3 IL-10

Die Bet v 1-spezifische IL-10-Sekretion unter subkutaner Allergengabe zeigte in der vorliegenden Studie einen initialen Anstieg während der ersten Pollensaison. Im anschließenden Verlauf der Immuntherapie war keine weitere Zunahme des IL-10-Spiegels zu verzeichnen. Vielmehr entsprach die Zytokinsekretion den Vortherapiewerten. Dieser frühe Anstieg der IL-10-Konzentration bzw. IL-10-produzierender T-Zellen konnte auch in anderen Studien belegt werden, welche im weiteren Verlauf der SIT ebenfalls eine Abnahme der Konzentration beobachteten, die mehrheitlich auf das Ausgangsniveau zurückging (Movérare et al., 2000a; Nieminen et al., 2009; Möbs et al., 2012; O'Hehir et al., 2009). Der in dieser und anderen Arbeiten dokumentierte kurzzeitige Anstieg der Bet v 1-spezifischen IL-10-Sekretion könnte in einer klonalen Expansion bereits bestehender Gedächtnis-T-Zellen (Meiler et al., 2008) oder in der Bildung neuer Tr1-Zellen aus dem Pool naiver T-Zellen begründet sein (Bacchetta et al., 2002; Roncarolo et al., 2006).

Auch bei Nicht-Allergikern, welche als Bienenzüchter einer multiplen Anzahl von Bienenstichen ausgesetzt waren, konnte durch die vermehrte Giftexposition eine erhöhte Menge an IL-10 detektiert werden. Zellulär wurde ein Wechsel von bienengiftspezifischen Th1- und Th2-Zellen zu IL-10-sezernierenden Tr1-Zellen innerhalb weniger Tage beschrieben. Dieser Wechsel zeigte sich auch in einer Verminderung des Th2-Zytokins IL-4 und des Th1-Zytokins IFN γ (Meiler et al., 2008). In Untersuchungen zur Bienengift-SIT mittels *Rush*-Protokoll wurde ein frühzeitiger

signifikanter Anstieg des IL-10-Levels festgestellt, welcher nach 28 Tagen sein Maximum erreichte. Zu diesem Zeitpunkt war auch die periphere Toleranzentwicklung voll ausgebildet. Es konnte des Weiteren eine Hemmung der T-Zell-Proliferation und eine Unterdrückung der Th1- und Th2-Zytokinsynthese durch IL-10 festgestellt werden, so dass postuliert wurde, dass IL-10 eine T-Zellanergie induziert (Akdis et al., 1998). Untersuchungen der hier vorliegenden Daten konnten diesen sehr frühen IL-10 Anstieg nach 28 Tagen nicht bestätigen. Mitverantwortlich für diese Diskrepanz in der IL-10-Entwicklung können Unterschiede in der Therapieform (*rush*-SIT versus konventionelle SIT; siehe oben), der zugrundeliegenden Allergene (Bienengift versus Birkenpollen) und des Studienprotokolls (Messung nach 7 und 28 Tagen, Messung erst nach einem Monat) sein.

In Studien, deren Untersuchungszeiträume eine längere Beobachtungsphase umfassten, konnte hingegen das Sekretionsmuster der hier präsentierten Daten bestätigt werden. So berichteten Bohle et al. von einem Anstieg der IL-10-sekretierenden CD3⁺ T-Zellen bei Birkenpollenallergikern unter SIT ausschließlich in der Einleitungsphase. Nach Ablauf des ersten Jahres war diese Zunahme nicht mehr vorhanden (Bohle et al., 2007). Eine Reduktion der IL-10-Produktion nach zwölfmonatiger SIT wurde ebenfalls von Eifan et al. beschrieben (Eifan et al., 2010).

Als mögliche Ursache für den Abfall der IL-10-Sekretion nach der ersten Birkenpollensaison wird eine Rekrutierung der Tr1-Zellen zum Effektororgan diskutiert, um dort die Toleranz gegenüber Allergenen auf lokaler Ebene zu beeinflussen (Radulovic et al., 2008; Anderson et al., 2009). Auch die kurze Lebensspanne der SIT-induzierten Treg-Zellen und ihre schnelle Entfernung aus der Peripherie könnte in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen (Vukmanovic-Stejić et al., 2006). Da die Aktivierung allergenspezifischer Treg-Zellen von Teff-Zellen beeinflusst wird (Grindebacke et al., 2009; Vignali et al., 2008), könnte zudem die verminderte Bet v 1-spezifische Th-Zellantwort in den späteren Pollensaisons auch ein Grund für die fehlende IL-10-Produktion durch allergenspezifische Tr1-Zellen nach der ersten Saison sein. In einer neueren Studie wurde in diesem Zusammenhang vermutet, dass die Bedeutung von IL-10 eher in der Initiation als in der Aufrechterhaltung von Toleranz gegenüber Allergenen liegt (Möbs et al., 2012).

Für den Fortbestand der Toleranzentwicklung scheint vielmehr eine generelle Reduktion der allergenspezifischen T-Zellantwort durch SIT-induzierte T-Zelldepletion oder T-Zellanergie von Bedeutung zu sein (Bohle et al., 2007; Gardner et al., 2004). In diesem Kontext zeigte eine Untersuchung der Auswirkungen einer SLIT auf

Birkenpollenallergiker nach vierwöchiger Therapie eine erhöhte IL-10-mRNA-Konzentration, nach einem Jahr wurde die allergenspezifische Zytokinexpression dann von IFN γ -mRNA dominiert. Durch Zugabe von anti-IL-10 oder Depletion der CD25⁺ Zellen konnte nach vierwöchiger Therapie die antigeninduzierte Proliferation erhöht werden. Nach einjähriger Therapie führte dies nicht mehr zu einer verstärkten Bet v 1-spezifischen Proliferation. Da niedrigere Allergendosen wie in den ersten vier Wochen der Behandlung aktive Suppression fördern und höhere Allergendosen wie in der Erhaltungsphase die klonale Deletion und Anergie verstärken (Chen et al., 1994; Chen et al., 1995), wurde angenommen, dass in der Frühphase der SLIT eine aktive Suppression durch IL-10-produzierende Treg-Zellen vorherrscht, wohingegen nach einjähriger Therapie die Induktion von Anergie bzw. die klonale Deletion und die im Vordergrund zu stehen scheinen (Bohle et al., 2007).

5.3.2.2.4 TGF- β

TGF- β wirkt immunsuppressiv und hemmt somit die T-Zellproliferation und die Makrophagenaktivierung. Es wird von Th-Zellen, Treg-Zellen und Makrophagen exprimiert. Das Zytokin TGF- β konnte in dieser Studie nur vereinzelt detektiert werden. Die TGF- β -Daten zeigten jedoch keine wesentlichen Änderungen im gesamten Therapieverlauf. In immunologischen Untersuchungen zur SIT scheint TGF- β keine herausgehobene Rolle einzunehmen, da in der Literatur nur wenige Studien mit allergenspezifischer TGF- β -Detektion beschrieben werden.

So konnte die TGF- β -mRNA-Expression von SIT-behandelten RCA-Probanden einer Studie keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu Allergikern zeigen (Savolainen et al., 2004). Auch nach einjähriger SLIT bei Birkenpollenallergikern (Bohle et al., 2007) und nach mindestens 1,5 Jahren Graspollen-Immuntherapie konnten keine Veränderungen im TGF- β -Level festgestellt werden (Francis et al., 2003).

In Gegensatz dazu ließ sich in einer Untersuchung zur Immuntherapie bei Hausstauballergikern nach 70 Tagen neben deutlich erhöhten IL-10-Werten eine signifikant höhere TGF- β -Konzentration feststellen. Ein Abfall war hingegen bei den Zytokinen IFN γ , IL-5 und IL-13 festzustellen (Jutel et al., 2003). Auch Pilette et al. konnten eine verstärkte TGF- β -Konzentration nachweisen, allerdings lokal im allergischen Effektororgangewebe (Untersuchung nasaler Biopsien unter Graspollen-Immuntherapie) (Pilette et al., 2007).

Mögliche Gründe dafür, dass die TGF- β -Konzentration der vorliegenden Studie weder eine Beeinflussung durch die SIT noch durch die natürliche Allergenexposition zeigte,

könnte eine zu geringe Sensitivität des ELISA bezüglich TGF- β (das Detektionslimit lag bei dem hier verwendeten Test bei 62,5 pg/ml, vgl. 5.2) oder auch eine primär in den Effektorgeweben vorherrschende Aktivität von TGF- β sein. Die Diskrepanz in den TGF- β Werten im Vergleich zu anderen Studien kann verschiedene Ursachen haben. Sie kann bedingt sein durch die Unterschiede im auslösenden Allergen (Hausstaub oder Graspollen versus Birkenpollen) oder in der angewendeten Form der Immuntherapie (*cluster semi-rush* versus konventionell). Ein weiterer Grund können die verschiedenen Detektionslimits der verwendeten ELISA (10 pg/ml versus 62,5 pg/ml) sein (Jutel et al., 2003). Auch könnten die konträren Ergebnisse auf der Untersuchung unterschiedlicher Kompartimente (Effektororgan bzw. peripheres Blut) beruhen (Pilette et al., 2007). Daten nasaler Biopsien könnten auch für ein eher lokales Geschehen der Immunantwort mit Veränderungen des TGF- β -Level im Effektororgan und nicht im peripheren Blut sprechen (Pilette et al., 2007). In verschiedenen Untersuchungen wurde dabei eine Verschiebung allergenspezifischer Treg-Zellen aus dem peripheren Blut zum Ort der allergischen Erkrankung diskutiert (Anderson et al., 2009; Radulovic et al., 2008).

5.3.2.2.5 IL-5/IFN γ -Verhältnis

Ob sich eine gesunde, nicht-allergische Immunantwort in die eines Allergikers entwickelt, könnte vom Verhältnis der allergenspezifischen Th2-Zellen zu den Th1-Zellen beeinflusst sein (Akdis et al., 1998; Akdis et al., 2004; Schulten et al., 2014). Lange Zeit wurde ein gestörtes Gleichgewicht zwischen diesen beiden Th-Zellpopulationen zugunsten einer vermehrten Th2-Zell-Antwort als primäre Ursache für das Auftreten allergischer IgE-vermittelter Erkrankungen angesehen (Romagnani, 2006). Deshalb wird postuliert, dass die Korrektur dieses Ungleichgewichts ein wichtiger Parameter für eine erfolgreiche SIT ist (Benjaponpitak et al., 1999; Bohle et al., 2007; Schulten et al., 2014).

In der hier vorliegenden Arbeit ließ sich zwar eine Reduktion des saisonalen IL-5-Anstiegs nach dem ersten Behandlungsjahr, jedoch keine Erhöhung der IFN γ -Sekretion dokumentieren. Es zeigt sich somit kein Wechsel der Th-Zellpopulationen. Eine Toleranzinduktion ließ sich dennoch in einer deutlichen Reduktion der klinischen Symptome nachweisen. Ein Grund dafür könnte eine mögliche Schlüsselrolle der Treg-Zellen in der Toleranz-Etablierung gegenüber Allergenen oder eine Deletion allergenspezifischer Th2-Zellen sein (Akdis and Akdis, 2011; Rolland et al., 2010; Wambre et al., 2014).

Bei Movérare et al. war das Verhältnis zwischen Th2-Zell-Zytokinen und IFN γ bei SIT-Patienten Th2-Zell-dominiert. Der Th2-Th1-Zellwechsel fand somit hier wie auch in unserer Studie nicht statt. Stattdessen korrelierte die IL-5-Konzentration in der Saison mit einer starken Symptomreduktion. Bei anderen Zytokinen ließ sich solch eine Wechselbeziehung nicht detektieren. Nach Movérare et al. ging diese Symptomreduktion jedoch eher auf Veränderungen im Effektororgan als in der zirkulierenden PBMC-Population zurück (Movérare et al., 2000a; Movérare et al., 2000b). Dies könnte auch in der vorliegenden Studie ein Grund für die bereits in der ersten Birkenpollensaison reduzierten klinischen Parameter sein.

5.3.2.2.6 IL-5/IL10-Verhältnis

Im Kontext der Toleranzinduktion gegenüber Allergenen weisen neuere Untersuchungen auf eine wichtige Rolle der Treg-Zellen hin (Akdis and Akdis, 2011; Rolland et al., 2010). Dabei scheinen besonders IL-10-produzierende Tr1-Zellen eine bedeutende Funktion einzunehmen (Möbs et al., 2012).

Bei Betrachtung des Quotienten aus IL-5 als potentiellm Förderer und IL-10 als vermutlichem Unterdrücker einer allergischen Immunantwort fällt in der hier vorliegenden Studie das in der ersten Pollensaison vorhandene IL-5-Übergewicht auf. Unter dem Einfluss der SIT etablierte sich ab der dritten Saison zwar ein IL-10-dominiertes Verhältnis, jedoch wurde diese Verschiebung nicht durch einen Anstieg der IL-10-Produktion hervorgerufen, sondern beruht auf einer Reduktion der IL-5-Konzentration.

Das Absinken der IL-5-Sekretion kann auf einer Th2-Anergie durch vermehrte Apoptose von IL4⁺ T-Zellen oder auf einer Steigerung der Suppressionskapazität der CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg-Zellen beruhen. In weitergehenden Untersuchungen zu den Wirkungsmechanismen der SIT konnte jedoch trotz vermehrter IL-10-Produktion keine verstärkte Th2-Zell-Hemmung durch CD25⁺ Treg-Zellen festgestellt werden. Das IL-5-Level blieb über den sechsmonatigen Untersuchungszeitraum durch die Anwesenheit der CD25⁺ Treg-Zellen unbeeinflusst (Grindebacke et al., 2009). Der transiente IL-10-Sekretionsanstieg in der Frühphase der Therapie könnte daher in erster Linie in peripheren Th-Zellen eine Anergie induzieren und so einer Th2-dominierten Immunantwort entgegenwirken (Groux et al., 1996).

Zusätzlich könnte eine direkte, IL-10-vermittelte Inhibition allergenspezifischer Effektorzellen wie z.B. Mastzellen zu einer Verbesserung der klinischen Beschwerden beitragen (Royer et al., 2001).

5.3.2.2.7 Zytokine im peripheren Blut und im Effektorgewebe allergischer Reaktionen

Im Gegensatz zu einem Teil der bisher diskutierten Daten konnten in einigen Studien keine Veränderungen in der peripheren allergenspezifischen Zytokinproduktion nachgewiesen werden.

So zeigten Untersuchungen bei SIT-behandelten Hausstauballergikern keine Veränderungen der IL-5-, IFN γ - und TGF- β -Konzentration (Eifan et al., 2010). Lediglich in der bereits zuvor beschriebenen Reduktion der IL-10-Produktion nach zwölfmonatiger Therapie ließ sich eine SIT-induzierte Modifikation der Immunantwort erkennen. Auch in anderen Arbeiten konnten keine Veränderungen der allergenspezifischen Zytokinantwort unter SIT im peripheren Blut nachgewiesen werden (Klimek et al., 1999; Movérare et al., 2000b). So fanden sich nach 18-monatiger Immuntherapie weder für IL-10 noch für IFN γ Veränderungen. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die konventionelle SIT zu keinen signifikanten Änderungen im Zytokinprofil der zirkulierenden allergenspezifischen T-Zellen in der Saison führt (Movérare et al., 2000b). Ein Nachteil der Studie war allerdings, dass die Erhebung der Daten nur zu einem Zeitpunkt erfolgte, nämlich innerhalb der zweiten Birkenpollensaison. Damit können die Ergebnisse nur zwischen SIT-behandelten Patienten, Allergikern und Nicht-Atopikern und nicht im Zeitverlauf verglichen werden.

Eine mögliche Ursache für die nicht detektierten peripheren Zytokinveränderungen könnte in der bereits diskutierten Verlagerung des immunologischen Geschehens in die Effektororgane liegen. Im Verlauf der Immunantwort kommt es zur Proliferation und klonalen Vermehrung der selektierten T-Lymphozyten in den regionären Lymphknoten. Anschließend wandern die reifen Lymphozyten an den Ort der allergischen Reaktion. Die Rekrutierung der Zellen in das Effektororgan könnte somit eine Ursache für die relativ geringe Schwankung einzelner Zytokinlevel (IFN γ , TGF- β) im peripheren Blut sein und Ergebnisse mit ausschließlich lokalen Unterschieden im Effektororgan begründen.

So wiesen Radulovic et al. in der Graspollensaison durch immunhistochemische Analysen einen signifikanten Anstieg der CD25⁺Foxp3⁺ Zellen in der nasalen Mukosa SIT-behandelter Graspollenallergiker nach (Radulovic et al., 2008). Deutlich erhöhte TGF- β -Werte konnten ebenfalls in nasalen Biopsien festgestellt werden (Pilette et al., 2007). Auch eine Erhöhung der IFN γ -mRNA-Expression und ein Abfall der IL-5-mRNA-Expression konnte bei Graspollenallergikern in der nasalen Mukosa unter SIT gezeigt werden (Durham et al., 1996; Wilson et al., 2001b).

In einer Studie von Wachholz et al. wurden Veränderungen sowohl bei nasalen Biopsien als auch bei PBMC unter Graspollen-SIT untersucht. In der nasalen Mukosa

zeigten sich dabei signifikante IFN γ -mRNA Anstiege, ein Zunahme der IL-5-mRNA Expression bei placebo-therapierten Allergikern und ein Anstieg des IFN γ /IL-5-Quotienten unter SIT. Die Analyse der PBMC Proben konnte dagegen weder bei SIT-behandelten noch bei placebo-therapierten Probanden signifikante Unterschiede aufzeigen (Wachholz et al., 2002). Bei Birkenpollenallergikern mit präseasonaler Allergoid-SIT wurden mögliche Effekte der Behandlung ebenfalls durch Nasensekretproben und Blutabnahmen vor und nach der Therapie evaluiert. Die Untersuchung der Daten zeigte eine Zunahme des IFN γ -Levels und eine Abnahme der IL-5-Konzentration im nasalen Sekret. Im peripheren Blut wurden wiederum keine Veränderungen im IL-4-, IL-5-, IFN γ - oder IL-10-Level gefunden (Klimek et al., 1999). Zusammengenommen könnten diese Daten dafür sprechen, dass Änderungen im peripheren T-Zell-Kompartiment nicht präzise genug lokale Abläufe im Effektororgan oder im zuführenden Lymphknoten widerspiegeln. Vielmehr scheinen lokale Immunmechanismen relevanter für die klinische Antwort auf eine SIT zu sein (James and Durham, 2008). Möglicherweise zeigt sich der immunologische Effekt der SIT somit eher am Ort der allergischen Entzündung als in Veränderungen im Bereich der zirkulierenden T-Zellen (Klimek et al., 1999). Die hier gemessenen Werte belegen zwar Auswirkungen der SIT auf die periphere Zytokinproduktion, allerdings sind diese schwach und möglicherweise in den lokalen Effektororganen deutlich stärker.

Zusammenfassend zeigen die Daten der angeführten Literatur und die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Beeinflussung der allergenspezifischen Zytokinproduktion durch die SIT in einem multifaktoriellen Zusammenspiel mit humoralen und zellulären Komponenten zur Toleranzinduktion bei Typ-I-Allergikern führt. Hierbei beeinflussen sich die einzelnen Faktoren zum Teil gegenseitig und sind zeitabhängig in unterschiedlichem Ausmaß an der Wiederherstellung der Allergentoleranz beteiligt. Entscheidend erscheint die letztendlich anhaltende Minderung der saisonalen Th2-Zytokinproduktion (signifikant im dritten Behandlungsjahr), während vermutlich das potentiell immunregulatorisch und suppressiv wirkende Zytokin IL-10 nur einen transienten, initialen Einfluss hat und IFN γ ohne wesentliche Bedeutung ist.

5.4 Die Frequenz Bet v 1-spezifischer T-Zellen im Vergleich zur quantitativen Zytokinanalyse

Zur Bestimmung der durch die SIT hervorgerufenen Modifikationen auf zellulärer Ebene wurde das ELISA-Verfahren angewendet, wobei die Menge des produzierten Zytokins erfasst wurde. Zusätzlich zu der quantitativen Erfassung des Zytokinprofils der studienteilnehmenden Probanden wurde von Möbs et al. die Frequenz Bet v 1-spezifischer T-Zellen dieser Probanden durch das ELISPOT-Verfahren ermittelt (Möbs et al., 2010; Möbs et al., 2012). Durch diese Methode kann die Anzahl antigenspezifischer Zellen anhand ihrer Zytokinsekretion nach Stimulation durch das entsprechende Antigen detektiert werden. Anhand der Freisetzung der Markerzytokine IL-5, IFN γ und IL-10 konnte die zytokinproduzierende Zelle der jeweiligen T-Zellpopulation, d.h. Th1-Zellen, Th2-Zellen bzw. Tr1-Zellen, zugeordnet werden (vgl. 5.2) (Czerkinsky et al., 1988). Da sowohl Veränderungen in der Zytokinsekretion durch die Messungen dieser Arbeit als auch Veränderungen in der Anzahl zytokinproduzierender T-Zellen im gleichen Patientenkollektiv erfasst wurden, ist nun eine vergleichende Interpretation der beiden Ergebnisse möglich.

Die Frequenzanalyse Bet v 1-spezifischer T-Zellen zeigte einen signifikanten Anstieg der Th-2-Zellen in der ersten Saison (m6). Anschließend sank die Frequenz unter das Niveau vor Einleitung der SIT (Abb. 25). Im Vergleich zur ersten Pollenflugzeit war in der zweiten (m18) und dritten (m30) Birkenpollensaison ein deutlich reduzierter Anstieg der IL-5-produzierenden Zellen zu verzeichnen. Die Frequenz IFN γ -sezernierender allergenspezifischer T-Zellen wies ebenfalls einen tendenziellen Anstieg in m6 auf. Jedoch nahm ihre Anzahl im Anschluss daran deutlich ab. Änderungen in der Anzahl IL-10-produzierender Zellen wurden bereits zum Ende der Einleitungsphase (m3) festgestellt. Diese signifikante Frequenzerhöhung hatte ihr Maximum in der ersten Birkenpollensaison und war auch ein Jahr nach Therapiebeginn deutlich über dem Niveau vor Einleitung der Therapie. Ab Monat m18 sank die Anzahl der IL-10-produzierenden Zellen wieder auf ähnliche Zellzahlen wie vor der Therapieeinleitung.

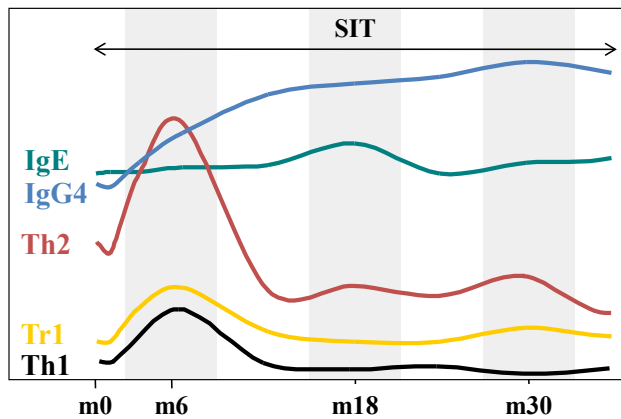


Abb. 25: Frequenzanalyse Bet v 1-spezifischer T-Zellen unter spezifischer Immuntherapie (SIT)

Die erste Birkenpollensaison (m6) war durch einen deutlichen Anstieg allergenspezifischer T-Helfer (Th) 2-Zellen, Th1-Zellen und Typ-1-regulatorische T (Tr1)-Zellen gekennzeichnet. Auch die Konzentration allergenspezifischer protektiv wirkender IgG4-Antikörper nahm in dieser Phase zu, wobei dieser Anstieg über den gesamten Verlauf konstant blieb. IgG4 kann die IgE-Bindung an Antigene blockieren und ist wesentlich an der Abschwächung der allergischen Immunantwort beteiligt. Im weiteren Verlauf der SIT waren keine saisonalen (m18, m30) Anstiege der Th2-Zellzahl zu dokumentieren. Die Tr1 Anzahl sank auf das Ausgangsniveau vor Therapie zurück (modifiziert nach Leung and Szeffler, 2012).

Die IL-5-Sekretion zeigte in Übereinstimmung mit den ELISPOT-Daten einen maximalen Anstieg in der ersten Birkenpollensaison unter SIT (m6). In den folgenden Birkenpollenflugzeiten (m18, m30) konnte zwar noch eine Zunahme dokumentiert werden, welche in ihrer Höhe aber deutlich reduziert war.

Die signifikante Abnahme der Bet v 1-spezifischen IFN γ -produzierenden T-Zellen im Verlauf der SIT konnte ebenso mit den ELISA-Daten bestätigt werden. Eine der tendenziellen Erhöhung der Frequenz IFN γ -produzierender Zellen zum Zeitpunkt m6 entsprechende Zunahme der IFN γ -Konzentration im peripheren Blut konnte jedoch in dieser Studie erst zu m12 nachgewiesen werden. Die IFN γ -Produktion zeigte mit Ausnahme von m12 im gesamten Verlauf der dreijährigen SIT keine weiteren Zunahmen der Zytokinsekretion.

Durch die ELISA-Untersuchungen dieser Studie konnte ebenfalls eine tendenzielle Zunahme der IL-10-Konzentration zu Beginn der Erhaltungsphase (m6) detektiert werden. Jedoch war eine im peripheren Blut nachweisbare Zunahme der Sekretion nur zum Zeitpunkt m6 vorhanden und begann nicht wie der signifikante Anstieg der IL-10-produzierenden Zellen bereits in der Einleitungsphase (m3). Im Gegensatz zu den Veränderungen in der Frequenz Bet v 1-spezifischer IL-10-sezernierender Zellen war der Einfluss der SIT auf die systemisch messbare IL-10-Produktion gering. Grundsätzlich konnte jedoch im Konsens mit anderen Studien (Bohle et al., 2007; Van Ree et al., 1997) der kurzzeitige Anstieg von IL-10 zu Beginn der SIT bestätigt werden.

Zusammenfassend bestätigen die hier dargestellten ELISA-Daten die Ergebnisse der ELISPOT-Untersuchung von Möbs et al., nämlich eine SIT-induzierte Abnahme der Bet v 1-spezifischen Th2-Zellantwort nach dem ersten Behandlungsjahr mit stetig verminderten saisonalen Anstiegen unter SIT und eine initiale, temporäre Aktivierung von Bet v 1-spezifischen IL-10-produzierenden Tr1-Zellen zu Beginn der Therapie als wesentliche Faktoren einer Toleranzentwicklung durch die SIT.

5.5 Wirkungen der Allergenexposition auf das Immunsystem von Nicht-Allergikern

Ziel einer SIT ist eine Reduktion der allergenspezifischen T-Zellantwort mit der Etablierung einer physiologischen Immunreaktion gegenüber Allergenen entsprechend der Immunantwort eines gesunden, nicht allergischen Menschen.

Studien zur allergenspezifischen T-Zellantwort bei gesunden Individuen zeigten ein breites Spektrum an möglichen Immunreaktionen, von nicht detektierbaren bis hin zu Immunantworten mit Beteiligung peripherer Toleranzmechanismen (Akdis, 2006). So konnten Van Overtvelt et al. belegen, dass sowohl Nicht-Allergiker als auch Allergiker Bet v 1-spezifische Zellen unter repetitiver Exposition bilden (Van Overtvelt et al., 2008). Dabei sezernierten allergenspezifische CD4⁺ T-Zellen von gesunden Individuen IFN γ und IL-10, während allergische Patienten ein Th2-Zytokinprofil mit Freisetzung von IL-5 und wenig IL-10 zeigten. Zusätzlich fanden sich in den Blutproben von gesunden Probanden Bet v 1-spezifische Treg-Zellen, welche zusammen mit Th1-sezerniertem IFN γ zu einer gemischten Th1/Treg-Zellantwort führten. Es wurde weiterhin nachgewiesen, dass sich die Anzahl Bet v 1-spezifischer T-Zellen in der Saison von 10^{-6} auf 10^{-3} CD4⁺T-Zellen erhöhen kann.

Bei einer großen Anzahl gesunder Individuen zeigten die T-Zellen allerdings keine allergenspezifische Proliferation in der PBMC-Kultur. Eine Erklärung dafür kann eine zu geringe Anzahl spezifischer T-Zellen bei fehlender/unzureichender Exposition sein. Sobald diese Exposition zunimmt, könnte eine aktive Suppression dieser Zellen durch Treg-Zellen bei gesunden Individuen eine Proliferation allergenspezifischer T-Zellen verhindern (Akdis et al., 2004; Ling et al., 2004).

Diese aktive Suppression konnte beispielsweise bei nicht-allergischen Bienenzüchtern nach sensibilisierender Allergenexposition festgestellt werden (Meiler et al., 2008). Hier fand sich nach multiplen Bienenstichen ein Wechsel von bienengiftspezifischen Th1- und Th2-Zellen zu IL-10-sezernierenden Tr1-Zellen. Da bei Bienengiftallergikern, die eine Bienengift-SIT erhielten, auch eine Zunahme IL-10-produzierender CD4⁺CD25⁺ T-Zellen auftrat, die mit einer Hemmung der allergenspezifischen T-Zell-Proliferation und der Th1-/Th2-Zytokinsekretion einherging, wurde sowohl für die SIT-induzierte Toleranz als auch für die gesunde, nicht-allergische Immunantwort auf Allergene eine durch Treg-Zellen vermittelte Immunsuppression als bedeutsam angesehen. So kam es zusätzlich zur Hochregulation des Histaminrezeptors 2 auf spezifischen Th2-Zellen und zu einem Anstieg der IL-10-Produktion, der auf eine Schlüsselfunktion dieses Zytokins für die natürlich induzierte T-Zellenergie hinweisen könnte.

Zwar zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit eine IL-10-Sekretion bei Nicht-Allergikern, allerdings war diese unter natürlicher Allergenexposition während der Pollensaison nicht erhöht, sondern sogar eher niedriger als außerhalb der Saison. In Übereinstimmung mit Daten zur Frequenz IL-10-sezernierender Tr1-Zellen von Möbs et al. (Möbs et al., 2010) spricht dies somit gegen eine entscheidende Rolle von IL-10 bei der natürlichen Allergenantwort.

Für die Th-Zytokine zeigte sich ein geringes IFN γ -Level, eine IL-5-Produktion ließ sich nicht detektieren. Diese Ergebnisse wurden auch von Akdis et al. bestätigt (Akdis et al., 2004). Dabei zeigten sowohl die Frequenzanalyse Bet v 1-spezifischer CD4⁺ T-Zellen als auch das ELISPOT-Verfahren bei gesunden Individuen ein geringes Ausmaß an IL-4- und IFN γ -sekretierenden T-Zellen. Die insgesamt erhöhte IL-10- (und TGF- β -) Sekretion haben in gesunden Individuen möglicherweise eine basale suppressive Wirkung, da durch Neutralisation dieser Zytokine die allergenspezifische T-Zell-Proliferation und Zytokinproduktion verstärkt wurden (Jutel et al., 2003).

5.6 Zusammenfassende Bewertung

Im Folgenden sollen abschließend Wechselwirkungen zwischen den in dieser Studie beobachteten zellulären Veränderungen und den humoralen Faktoren, die in Zusammenhang mit der Entwicklung einer allergenspezifischen Toleranzinduktion stehen, diskutiert werden (Abb. 26).

Neben der Verbesserung des klinischen Krankheitsbildes führte die Immuntherapie zellulär zu Beginn der SIT zu einer kurzzeitigen Induktion Bet v 1-spezifischer Tr1-Zellen mit entsprechender IL-10-Sekretion. Außerdem zeigte sich unter der Therapie

neben einer temporären IFN γ -Erhöhung nach einjähriger SIT eine kontinuierliche Reduktion der ursprünglich erhöhten saisonalen IL-5-Freisetzung.

Eine erfolgreiche Immuntherapie geht mit der Induktion von Toleranz in peripheren T-Zellen einher (Akdis et al., 1996; Blaser and Akdis, 2004; Bohle et al., 2007; Jutel et al., 2003). Dabei zeichnet sich die SIT durch Hemmung der proliferativen und zytokinerzeugenden Zellantwort auf Major-Allergene und ihrer T-Zellerkennungsregionen aus (Akdis et al., 1998; Jutel et al., 2003). Die Bildung von allergenspezifischen Treg-Zellen inklusive ihrer suppressiven Zytokine TGF- β und IL-10 wird als eine Voraussetzung für die Entwicklung der T-Zelltoleranz beschrieben.

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen allerdings, dass Treg-Zellen vorzugsweise zu Beginn der Toleranzinduktion bedeutsam sind. Für den langfristigen Effekt scheint primär der Verlust allergenspezifischer Th2-Zellen mit Sistieren der IL-5-Produktion entscheidend zu sein.

Weiterhin ist die Allergentoleranz in einer Vielzahl von Studien mit der Generierung anti-inflammatorisch wirkender Antikörper, wie IgG4, assoziiert (Akdis et al., 2005; Möbs et al., 2008; Pilette et al., 2007). Zusätzliche Effekte sind durch die Unterdrückung der Spätphase- und Effektorzell-Reaktionen gekennzeichnet (Durham and Till, 1998; Shim et al., 2003; Treter and Lugin, 2000). Die Zahl an Effektorzellen (bspw. eosinophile Granulozyten, Mastzellen) wird durch die SIT ebenfalls vermindert. Das führt zu einer reduzierten Freisetzung von Entzündungsmediatoren und zu einer klinischen Verbesserung des Krankheitsbildes (Creticos et al., 1985; Rak et al., 1988; Suárez-Fueyo et al., 2014; Wilson et al., 2001a).

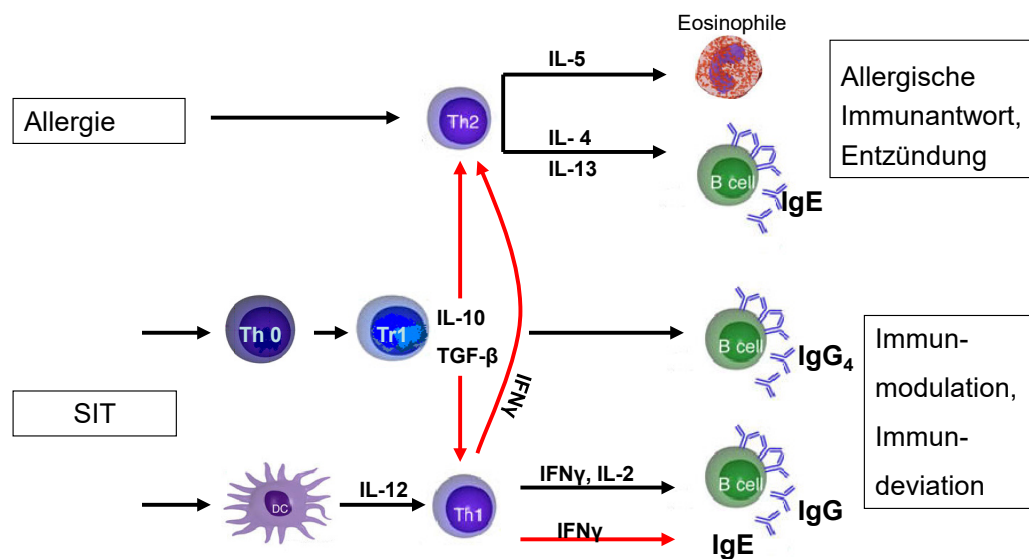


Abb. 26: Wirkungsweise der spezifischen Immuntherapie (SIT) auf die allergische Immunantwort

Eosinophile Granulozyten werden durch die Interleukin (IL)-5-Produktion der T-Helfer (Th)2-Zellen induziert und prägen zusammen mit der IgE-Synthese der B-Zellen (*B cell*), eingeleitet durch IL-4 und IL-13, die Entstehung einer allergischen Entzündung.

Die SIT verstärkt die Generation der Typ-1-regulatorischen T (Tr1)-Zellen und hemmt mit deren Zytokinen IL-10 und *transforming growth factor*(TGF)- β die Funktion der Th1- und Th2-Zellen. Zusätzlich stimuliert IL-10 die IgG4 Antikörperproduktion. Die SIT induziert eine gegenregulatorische Th1-Zell-Immunantwort: IL-12 aus antigenpräsentierenden Zellen, wie *dendritic cell* (DC), verstärkt die Th1-Zell-Generierung. Über Interferon (IFN) γ hemmen die Th1-Zellen die Th2-Zelldifferenzierung und die IgE-Synthese. Gleichzeitig induzieren die Th1-Zellen den IgG-Klassenwechsel. Rote Pfeile stehen für Suppression; schwarze Pfeile bedeuten Induktion (Modifiziert nach Kleine-Tebbe et al., 2009).

Zusammenfassend konnten die Daten der vorliegenden Studie die zeitliche Dynamik der zellulären Komponente der SIT-Toleranzentwicklung durch Induktion und Repression der einzelnen Zytokine zu unterschiedlichen Zeitpunkten der SIT unterstreichen. Hierbei ist die Quantität der einzelnen Zytokine nicht isoliert zu betrachten. Vielmehr scheint das differenzierte, multifaktorielle Zusammenspiel der Zytokine untereinander und ihre Interaktion mit der zellulären und humoralen Immunabwehr entscheidend zu sein.

6 Literaturverzeichnis

- Akdis, C. A. and Akdis, M. (2009) 'Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells', *J Allergy Clin Immunol*, 123(4), pp. 735-46; quiz 747-8.
- Akdis, C. A. and Akdis, M. (2011) 'Mechanisms of allergen-specific immunotherapy', *J Allergy Clin Immunol*, 127(1), pp. 18-27; quiz 28-9.
- Akdis, C. A., Akdis, M., Blesken, T., Wymann, D., Alkan, S. S., Muller, U. and Blaser, K. (1996) 'Epitope-specific T cell tolerance to phospholipase A2 in bee venom immunotherapy and recovery by IL-2 and IL-15 in vitro', *J Clin Invest*, 98(7), pp. 1676-83.
- Akdis, C. A., Blesken, T., Akdis, M., Wuthrich, B. and Blaser, K. (1998) 'Role of interleukin 10 in specific immunotherapy', *J Clin Invest*, 102(1), pp. 98-106.
- Akdis, C. A., Joss, A., Akdis, M. and Blaser, K. (2001) 'Mechanism of IL-10-induced T cell inactivation in allergic inflammation and normal response to allergens', *Int Arch Allergy Immunol*, 124(1-3), pp. 180-2.
- Akdis, M. (2006) 'Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more', *Curr Opin Immunol*, 18(6), pp. 738-44.
- Akdis, M., Blaser, K. and Akdis, C. A. (2005) 'T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases', *J Allergy Clin Immunol*, 116(5), pp. 961-8; quiz 969.
- Akdis, M., Verhagen, J., Taylor, A., Karamloo, F., Karagiannidis, C., Cramer, R., Thunberg, S., Deniz, G., Valenta, R., Fiebig, H., Kegel, C., Disch, R., Schmidt-Weber, C. B., Blaser, K. and Akdis, C. A. (2004) 'Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells', *J Exp Med*, 199(11), pp. 1567-75.
- Alvarez-Cuesta, E., Bousquet, J., Canonica, G. W., Durham, S. R., Malling, H. J., Valovirta, E. and EAACI, I. m. T. F. (2006) 'Standards for practical allergen-specific immunotherapy', *Allergy*, 61 Suppl 82, pp. 1-20.
- Anderson, A. E., Mackerness, K. J., Aizen, M., Carr, V. A., Nguyen, D., Du Pre, F., Durham, S. R. and Robinson, D. S. (2009) 'Seasonal changes in suppressive capacity of CD4⁺ CD25⁺ T cells from patients with hayfever are allergen-specific and may result in part from expansion of effector T cells among the CD25⁺ population', *Clin Exp Allergy*, 39(11), pp. 1693-9.
- Bacchetta, R., Sartirana, C., Levings, M. K., Bordignon, C., Narula, S. and Roncarolo, M. G. (2002) 'Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines', *Eur J Immunol*, 32(8), pp. 2237-45.
- Bauchau, V. and Durham, S. R. (2004) 'Prevalence and rate of diagnosis of allergic rhinitis in Europe', *Eur Respir J*, 24(5), pp. 758-64.
- Beasley, R., Crane, J., Lai, C. K. and Pearce, N. (2000) 'Prevalence and etiology of asthma', *J Allergy Clin Immunol*, 105(2 Pt 2), pp. S466-72.
- Bellinghausen, I., Klostermann, B., Knop, J. and Saloga, J. (2003) 'Human CD4⁺CD25⁺ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress TH1 and TH2 cytokine production', *J Allergy Clin Immunol*, 111(4), pp. 862-8.
- Bellinghausen, I., König, B., Böttcher, I., Knop, J. and Saloga, J. (2005) 'Regulatory activity of human CD4⁺ CD25⁺ T cells depends on allergen concentration, type of allergen and atopy status of the donor', *Immunology*, 116(1), pp. 103-11.
- Benjaponpitak, S., Oro, A., Maguire, P., Marinkovich, V., DeKruyff, R. H. and Umetsu, D. T. (1999) 'The kinetics of change in cytokine production by CD4⁺ T cells during conventional allergen immunotherapy', *J Allergy Clin Immunol*, 103(3 Pt 1), pp. 468-75.

- Benson, M., Strannegård, I. L., Strannegård, O. and Wennergren, G. (2000) 'Topical steroid treatment of allergic rhinitis decreases nasal fluid TH2 cytokines, eosinophils, eosinophil cationic protein, and IgE but has no significant effect on IFN-gamma, IL-1beta, TNF-alpha, or neutrophils', *J Allergy Clin Immunol*, 106(2), pp. 307-12.
- Blaser, K. and Akdis, C. A. (2004) 'Interleukin-10, T regulatory cells and specific allergy treatment', *Clin Exp Allergy*, 34(3), pp. 328-31.
- Bohle, B., Kinaciyan, T., Gerstmayr, M., Radakovics, A., Jahn-Schmid, B. and Ebner, C. (2007) 'Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation', *J Allergy Clin Immunol*, 120(3), pp. 707-13.
- Bousquet, J. and Khaltaev, N. (2007) *Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: a comprehensive approach*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Bousquet, J., Lockey, R. and Malling, H. J. (1998) 'Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper', *J Allergy Clin Immunol*, 102(4 Pt 1), pp. 558-62.
- Brożek, J. L., Bousquet, J., Agache, I., Agarwal, A., Bachert, C., Bosnic-Anticevich, S., Brignardello-Petersen, R., Canonica, G. W., Casale, T., Chavannes, N. H., Correia de Sousa, J., Cruz, A. A., Cuello-Garcia, C. A., Demoly, P., Dykewicz, M., Etxeandia-Ikobaltzeta, I., Florez, I. D., Fokkens, W., Fonseca, J., Hellings, P. W., Klimek, L., Kowalski, S., Kuna, P., Laisaar, K.-T., Larenas-Linnemann, D. E., Lødrup Carlsen, K. C., Manning, P. J., Meltzer, E., Mullol, J., Muraro, A., O'Hehir, R., Ohta, K., Panzner, P., Papadopoulos, N., Park, H.-S., Passalacqua, G., Pawankar, R., Price, D., Riva, J. J., Roldán, Y., Ryan, D., Sadeghirad, B., Samolinski, B., Schmid-Grendelmeier, P., Sheikh, A., Togias, A., Valero, A., Valiulis, A., Valovirta, E., Ventresca, M., Wallace, D., Wasserman, S., Wickman, M., Wiercioch, W., Yepes-Nuñez, J. J., Zhang, L., Zhang, Y., Zidarn, M., Zuberbier, T. and Schünemann, H. J. (2017) 'Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines - 2016 revision', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140(4), pp. 950-958.
- Bødtger, U., Poulsen, L. K., Jacobi, H. H. and Malling, H. J. (2002) 'The safety and efficacy of subcutaneous birch pollen immunotherapy - a one-year, randomised, double-blind, placebo-controlled study', *Allergy*, 57(4), pp. 297-305.
- Bühling, K., Lepenies, J. and Witt, K. (2008) *Intensivkurs: Allgemeine und spezielle Pathologie*. (4. Auflage): Urban & Fischer Verlag.
- Calderon, M. A., Alves, B., Jacobson, M., Hurwitz, B., Sheikh, A. and Durham, S. (2007) 'Allergen injection immunotherapy for seasonal allergic rhinitis', *Cochrane Database Syst Rev*, (1), pp. CD001936.
- Calderon, M. A., Casale, T. B., Togias, A., Bousquet, J., Durham, S. R. and Demoly, P. (2011) 'Allergen-specific immunotherapy for respiratory allergies: from meta-analysis to registration and beyond', *J Allergy Clin Immunol*, 127(1), pp. 30-8.
- Calderon, M. A., Mösges, R., Hellmich, M. and Demoly, P. (2010) 'Towards evidence-based medicine in specific grass pollen immunotherapy', *Allergy*, 65(4), pp. 420-34.
- Cazac, B. B. and Roes, J. (2000) 'TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo', *Immunity*, 13(4), pp. 443-51.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G. and Wahl, S. M. (2003) 'Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3', *J Exp Med*, 198(12), pp. 1875-86.
- Chen, W., Jin, W. and Wahl, S. M. (1998) 'Engagement of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) induces transforming growth factor beta (TGF-beta) production by murine CD4(+) T cells', *J Exp Med*, 188(10), pp. 1849-57.

- Chen, Y., Inobe, J., Marks, R., Gonnella, P., Kuchroo, V. K. and Weiner, H. L. (1995) 'Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance', *Nature*, 376(6536), pp. 177-80.
- Chen, Y., Kuchroo, V. K., Inobe, J., Hafler, D. A. and Weiner, H. L. (1994) 'Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis', *Science*, 265(5176), pp. 1237-40.
- Clay, T. M., Hobeika, A. C., Mosca, P. J., Lyster, H. K. and Morse, M. A. (2001) 'Assays for monitoring cellular immune responses to active immunotherapy of cancer', *Clin Cancer Res*, 7(5), pp. 1127-35.
- Coombs, R. R. A. and Gell, P. G. H. 1963. The classification of allergic reactions underlying disease. In: Gell PGH, Coombs RRA (eds) *Clinical aspects of immunology*: Davis, Philadelphia.
- Corrigan, C. J. and Kay, A. B. (1992) 'T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma', *Immunol Today*, 13(12), pp. 501-7.
- Cox, L. S., Larenas Linnemann, D., Nolte, H., Weldon, D., Finegold, I. and Nelson, H. S. (2006) 'Sublingual immunotherapy: a comprehensive review', *J Allergy Clin Immunol*, 117(5), pp. 1021-35.
- Creticos, P. S., Adkinson, N. F., Kagey-Sobotka, A., Proud, D., Meier, H. L., Naclerio, R. M., Lichtenstein, L. M. and Norman, P. S. (1985) 'Nasal challenge with ragweed pollen in hay fever patients. Effect of immunotherapy', *J Clin Invest*, 76(6), pp. 2247-53.
- Curotto de Lafaille, M. A. and Lafaille, J. J. (2009) 'Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?', *Immunity*, 30(5), pp. 626-35.
- Czerkinsky, C., Andersson, G., Ekre, H. P., Nilsson, L. A., Klareskog, L. and Ouchterlony, O. (1988) 'Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells', *J Immunol Methods*, 110(1), pp. 29-36.
- D'Amato G, Bonini S, Bosquet J, Durham SR and TAE, P.-M. (2001) 'Pollenosis 2000: Global Approach': JGC Editions, Naples, Italy.
- D'Amato, G., Cecchi, L., Bonini, S., Nunes, C., Annesi-Maesano, I., Behrendt, H., Liccardi, G., Popov, T. and van Cauwenberge, P. (2007) 'Allergenic pollen and pollen allergy in Europe', *Allergy*, 62(9), pp. 976-90.
- De Smedt, T., Van Mechelen, M., De Becker, G., Urbain, J., Leo, O. and Moser, M. (1997) 'Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function', *Eur J Immunol*, 27(5), pp. 1229-35.
- de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G. and de Vries, J. E. (1991) 'Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes', *J Exp Med*, 174(5), pp. 1209-20.
- Del Prete, G. F., De Carli, M., D'Elia, M. M., Maestrelli, P., Ricci, M., Fabbri, L. and Romagnani, S. (1993) 'Allergen exposure induces the activation of allergen-specific Th2 cells in the airway mucosa of patients with allergic respiratory disorders', *Eur J Immunol*, 23(7), pp. 1445-9.
- Des Roches, A., Paradis, L., Knani, J., Hejjaoui, A., Dhivert, H., Chanez, P. and Bousquet, J. (1996) 'Immunotherapy with a standardized Dermatophagoides pteronyssinus extract. V. Duration of the efficacy of immunotherapy after its cessation', *Allergy*, 51(6), pp. 430-3.
- Des Roches, A., Paradis, L., Menardo, J. L., Bouges, S., Daurès, J. P. and Bousquet, J. (1997) 'Immunotherapy with a standardized Dermatophagoides pteronyssinus extract. VI. Specific immunotherapy prevents the onset of new sensitizations in children', *J Allergy Clin Immunol*, 99(4), pp. 450-3.
- Douglass, J. A. and O'Hehir, R. E. (2006) '1. Diagnosis, treatment and prevention of allergic disease: the basics', *Med J Aust*, 185(4), pp. 228-33.

- Drachenberg, K. J., Wheeler, A. W., Stuebner, P. and Horak, F. (2001) 'A well-tolerated grass pollen-specific allergy vaccine containing a novel adjuvant, monophosphoryl lipid A, reduces allergic symptoms after only four preseasonal injections', *Allergy*, 56(6), pp. 498-505.
- Dretzke, J., Meadows, A., Novielli, N., Huissoon, A., Fry-Smith, A. and Meads, C. (2013) 'Subcutaneous and sublingual immunotherapy for seasonal allergic rhinitis: a systematic review and indirect comparison', *J Allergy Clin Immunol*, 131(5), pp. 1361-6.
- Durham, S. R. and Till, S. J. (1998) 'Immunologic changes associated with allergen immunotherapy', *J Allergy Clin Immunol*, 102(2), pp. 157-64.
- Durham, S. R., Varney, V., Gaga, M., Frew, A. J., Jacobson, M. and Kay, A. B. (1991) 'Immunotherapy and allergic inflammation', *Clin Exp Allergy*, 21 Suppl 1, pp. 206-10.
- Durham, S. R., Walker, S. M., Varga, E. M., Jacobson, M. R., O'Brien, F., Noble, W., Till, S. J., Hamid, Q. A. and Nouri-Aria, K. T. (1999) 'Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy', *N Engl J Med*, 341(7), pp. 468-75.
- Durham, S. R., Ying, S., Varney, V. A., Jacobson, M. R., Sudderick, R. M., Mackay, I. S., Kay, A. B. and Hamid, Q. A. (1992) 'Cytokine messenger RNA expression for IL-3, IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor in the nasal mucosa after local allergen provocation: relationship to tissue eosinophilia', *J Immunol*, 148(8), pp. 2390-4.
- Durham, S. R., Ying, S., Varney, V. A., Jacobson, M. R., Sudderick, R. M., Mackay, I. S., Kay, A. B. and Hamid, Q. A. (1996) 'Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4+ T lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increases the number of cells expressing messenger RNA for interferon-gamma', *J Allergy Clin Immunol*, 97(6), pp. 1356-65.
- Ebner, C., Siemann, U., Bohle, B., Willheim, M., Wiedermann, U., Schenk, S., Klotz, F., Ebner, H., Kraft, D. and Scheiner, O. (1997) 'Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from TH2 to TH1 in T-cell clones specific for Phl p 1, a major grass pollen allergen', *Clin Exp Allergy*, 27(9), pp. 1007-15.
- Eifan, A. O., Akkoc, T., Yildiz, A., Keles, S., Ozdemir, C., Bahceciler, N. N. and Barlan, I. B. (2010) 'Clinical efficacy and immunological mechanisms of sublingual and subcutaneous immunotherapy in asthmatic/rhinitis children sensitized to house dust mite: an open randomized controlled trial', *Clin Exp Allergy*, 40(6), pp. 922-32.
- Ekerfelt, C., Ernerudh, J. and Jenmalm, M. C. (2002) 'Detection of spontaneous and antigen-induced human interleukin-4 responses in vitro: comparison of ELISPOT, a novel ELISA and real-time RT-PCR', *J Immunol Methods*, 260(1-2), pp. 55-67.
- Elser, B., Lohoff, M., Kock, S., Giaisi, M., Kirchhoff, S., Krammer, P. H. and Li-Weber, M. (2002) 'IFN-gamma represses IL-4 expression via IRF-1 and IRF-2', *Immunity*, 17(6), pp. 703-12.
- Eng, P. A., Borer-Reinhold, M., Heijnen, I. A. and Gnehm, H. P. (2006) 'Twelve-year follow-up after discontinuation of preseasonal grass pollen immunotherapy in childhood', *Allergy*, 61(2), pp. 198-201.
- Enk, A. H., Saloga, J., Becker, D., Mohamadzadeh, M. and Knop, J. (1994) 'Induction of hapten-specific tolerance by interleukin 10 in vivo', *J Exp Med*, 179(4), pp. 1397-402.
- Eriksson, N. E. and Holmen, A. (1996) 'Skin prick tests with standardized extracts of inhalant allergens in 7099 adult patients with asthma or rhinitis: cross-sensitizations and relationships to age, sex, month of birth and year of testing', *J Investig Allergol Clin Immunol*, 6(1), pp. 36-46.
- Flicker, S. and Valenta, R. (2003) 'Renaissance of the blocking antibody concept in type I allergy', *Int Arch Allergy Immunol*, 132(1), pp. 13-24.

- Francis, J. N., James, L. K., Paraskevopoulos, G., Wong, C., Calderon, M. A., Durham, S. R. and Till, S. J. (2008) 'Grass pollen immunotherapy: IL-10 induction and suppression of late responses precedes IgG4 inhibitory antibody activity', *J Allergy Clin Immunol*, 121(5), pp. 1120-1125.e2.
- Francis, J. N., Till, S. J. and Durham, S. R. (2003) 'Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy', *J Allergy Clin Immunol*, 111(6), pp. 1255-61.
- Gan, S. D. and Patel, K. R. (2013) 'Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay', *J Invest Dermatol*, 133(9), pp. e12.
- Gardner, L. M., O'Hehir, R. E. and Rolland, J. M. (2004) 'High dose allergen stimulation of T cells from house dust mite-allergic subjects induces expansion of IFN-gamma+ T Cells, apoptosis of CD4+IL-4+ T cells and T cell anergy', *Int Arch Allergy Immunol*, 133(1), pp. 1-13.
- Gorelik, L., Constant, S. and Flavell, R. A. (2002) 'Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation', *J Exp Med*, 195(11), pp. 1499-505.
- Gorelik, L., Fields, P. E. and Flavell, R. A. (2000) 'Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression', *J Immunol*, 165(9), pp. 4773-7.
- Grammer, L. C., Zeiss, C. R., Suszko, I. M., Shaughnessy, M. A. and Patterson, R. (1982) 'A double-blind, placebo-controlled trial of polymerized whole ragweed for immunotherapy of ragweed allergy', *J Allergy Clin Immunol*, 69(6), pp. 494-9.
- Greiner, W., Graf von der Schulenburg, J. and Gillissen, A. (2003) 'Kosten und Nutzen der Hyposensibilisierung bei allergischem Asthma und Rhinitis', *Gesundheitsökonomie & Qualitätsmanagement*, 8, pp. 179-186.
- Grevers, G. and Röcken, M. (2008) *Taschenatlas Allergologie*. 2. Auflage: Georg Thieme Verlag.
- Grindebacke, H., Larsson, P., Wing, K., Rak, S. and Rudin, A. (2009) 'Specific immunotherapy to birch allergen does not enhance suppression of Th2 cells by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells during pollen season', *J Clin Immunol*, 29(6), pp. 752-60.
- Groux, H., Bigler, M., de Vries, J. E. and Roncarolo, M. G. (1996) 'Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells', *J Exp Med*, 184(1), pp. 19-29.
- Hahn, H., Kaufmann, S. H., Schulz, T. F. and Suerbaum, S. (2008) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 6. Auflage: Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Hansen, G., Berry, G., DeKruyff, R. H. and Umetsu, D. T. (1999) 'Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation', *J Clin Invest*, 103(2), pp. 175-83.
- Hellings, P. W., Vandenberghe, P., Kasran, A., Coorevits, L., Overbergh, L., Mathieu, C. and Ceuppens, J. L. (2002) 'Blockade of CTLA-4 enhances allergic sensitization and eosinophilic airway inflammation in genetically predisposed mice', *Eur J Immunol*, 32(2), pp. 585-94.
- Heydenreich, B., Bellinghausen, I., Lund, L., Henmar, H., Lund, G., Adler Würtzen, P. and Saloga, J. (2014) 'Adjuvant effects of aluminium hydroxide-adsorbed allergens and allergoids – differences in vivo and in vitro', *Clinical and Experimental Immunology*, 176(3), pp. 310-319.
- Hoft, D. F., Schnapp, A. R., Eickhoff, C. S. and Roodman, S. T. (2000) 'Involvement of CD4(+) Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*', *Infect Immun*, 68(1), pp. 197-204.
- Huang, T. J., MacAry, P. A., Eynott, P., Moussavi, A., Daniel, K. C., Askenase, P. W., Kemeny, D. M. and Chung, K. F. (2001) 'Allergen-specific Th1 cells counteract

- efferent Th2 cell-dependent bronchial hyperresponsiveness and eosinophilic inflammation partly via IFN-gamma', *J Immunol*, 166(1), pp. 207-17.
- Hui, Y., Li, L., Qian, J., Guo, Y. and Zhang, X. (2014) 'Efficacy analysis of three-year subcutaneous SQ-standardized specific immunotherapy in house dust mite-allergic children with asthma', *Exp Ther Med*, 7(3), pp. 630-634.
- Höiby, A. S., Strand, V., Robinson, D. S., Sager, A. and Rak, S. (2010) 'Efficacy, safety, and immunological effects of a 2-year immunotherapy with Depigoid birch pollen extract: a randomized, double-blind, placebo-controlled study', *Clin Exp Allergy*, 40(7), pp. 1062-70.
- Jacobsen, L., Niggemann, B., Dreborg, S., Ferdousi, H. A., Halken, S., Høst, A., Koivikko, A., Norberg, L. A., Valovirta, E., Wahn, U., Möller, C. and group, T. P. i. (2007) 'Specific immunotherapy has long-term preventive effect of seasonal and perennial asthma: 10-year follow-up on the PAT study', *Allergy*, 62(8), pp. 943-8.
- James, L. K. and Durham, S. R. (2008) 'Update on mechanisms of allergen injection immunotherapy', *Clin Exp Allergy*, 38(7), pp. 1074-88.
- Jarolim, E., Rumpold, H., Endler, A. T., Ebner, H., Breitenbach, M., Scheiner, O. and Kraft, D. (1989) 'IgE and IgG antibodies of patients with allergy to birch pollen as tools to define the allergen profile of *Betula verrucosa*', *Allergy*, 44(6), pp. 385-95.
- Jeannin, P., Lecoanet, S., Delneste, Y., Gauchat, J. F. and Bonnefoy, J. Y. (1998) 'IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10', *J Immunol*, 160(7), pp. 3555-61.
- Jutel, M., Akdis, M., Budak, F., Aebischer-Casaulta, C., Wrzyszczy, M., Blaser, K. and Akdis, C. A. (2003) 'IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy', *Eur J Immunol*, 33(5), pp. 1205-14.
- Jutel, M., Jaeger, L., Suck, R., Meyer, H., Fiebig, H. and Cromwell, O. (2005) 'Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens', *J Allergy Clin Immunol*, 116(3), pp. 608-13.
- Jutel, M., Pichler, W. J., Skrbic, D., Urwyler, A., Dahinden, C. and Müller, U. R. (1995) 'Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures', *J Immunol*, 154(8), pp. 4187-94.
- Kinet, J.-P. (1999) 'THE HIGH-AFFINITY IgE RECEPTOR (FcεRI): From Physiology to Pathology', *Annual Review of Immunology*, 17(1), pp. 931-972.
- Kleine-Tebbe, J., Bufe, A., Ebner, C., Eigenmann, P., Friedrichs, F., Fuchs, T., Huttegger, I., Jung, K., Klimek, L., Kopp, M., Lässig, W., Merk, H., Niggemann, B., Rabe, U., Saloga, J., Schmid-Grendelmeier, P., Sitter, H., Virchow, J. C., Wagenmann, M., Wedi, B. and Worm, M. (2009) 'Die spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung) bei IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen', *Allergo J*, 18, pp. 508-537.
- Klimek, L., Dormann, D., Jarman, E. R., Cromwell, O., Riechelmann, H. and Reske-Kunz, A. B. (1999) 'Short-term preseasonal birch pollen allergoid immunotherapy influences symptoms, specific nasal provocation and cytokine levels in nasal secretions, but not peripheral T-cell responses, in patients with allergic rhinitis', *Clin Exp Allergy*, 29(10), pp. 1326-35.
- Kolbe, L., Heusser, C. and Kölsch, E. (1991) 'Antigen dose-dependent regulation of B epsilon-memory cell expression', *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 95(2-3), pp. 202-6.
- Koolman, J. and Röhm, K. H. (2003) *Taschenatlas der Biochemie*. 3. Auflage: GeorgThieme Verlag, p. 294ff.
- Kunzmann, S., Wohlfahrt, J. G., Itoh, S., Asao, H., Komada, M., Akdis, C. A., Blaser, K. and Schmidt-Weber, C. B. (2003) 'SARA and Hgs attenuate susceptibility to TGF-beta1-mediated T cell suppression', *FASEB J*, 17(2), pp. 194-202.

- Larché, M., Akdis, C. A. and Valenta, R. (2006) 'Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy', *Nat Rev Immunol*, 6(10), pp. 761-71.
- Letterio, J. J. and Roberts, A. B. (1998) 'Regulation of immune responses by TGF-beta', *Annu Rev Immunol*, 16, pp. 137-61.
- Leung, D. Y. M. and Szefer, S. J. (2012) 'The Editors' Choice', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130(5), pp. 1063-1064.
- Ling, E. M., Smith, T., Nguyen, X. D., Pridgeon, C., Dallman, M., Arbery, J., Carr, V. A. and Robinson, D. S. (2004) 'Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease', *Lancet*, 363(9409), pp. 608-15.
- Lundgren, M., Persson, U., Larsson, P., Magnusson, C., Smith, C. I., Hammarström, L. and Severinson, E. (1989) 'Interleukin 4 induces synthesis of IgE and IgG4 in human B cells', *Eur J Immunol*, 19(7), pp. 1311-5.
- Luttmann, W., Dauer, E., Schmidt, S., Marx, O., Hossfeld, M., Matthys, H. and Virchow, J. C. (2000) 'Effects of interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha on CD95/Fas ligand-mediated apoptosis in human blood eosinophils', *Scand J Immunol*, 51(1), pp. 54-9.
- Macfarlane, A. J., Kon, O. M., Smith, S. J., Zeibecoglou, K., Khan, L. N., Barata, L. T., McEuen, A. R., Buckley, M. G., Walls, A. F., Meng, Q., Humbert, M., Barnes, N. C., Robinson, D. S., Ying, S. and Kay, A. B. (2000) 'Basophils, eosinophils, and mast cells in atopic and nonatopic asthma and in late-phase allergic reactions in the lung and skin', *J Allergy Clin Immunol*, 105(1 Pt 1), pp. 99-107.
- Mailing, H. J. and Weeke, B. (1993) 'Position Paper: Immunotherapy', *Allergy*, 48, pp. 9-35.
- Meiler, F., Zumkehr, J., Klunker, S., Rückert, B., Akdis, C. A. and Akdis, M. (2008) 'In vivo switch to IL-10-secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure', *J Exp Med*, 205(12), pp. 2887-98.
- Møllerup, M. T., Hahn, G. W., Poulsen, L. K. and Malling, H. (2000) 'Safety of allergen-specific immunotherapy. Relation between dosage regimen, allergen extract, disease and systemic side-effects during induction treatment', *Clin Exp Allergy*, 30(10), pp. 1423-9.
- Minang, J. T., Åreström, I. and Ahlberg, N. (2008) 'ELISpot displays a better detection over ELISA of T helper (Th) 2-type cytokine-production by ex vivo-stimulated antigen-specific T cells from human peripheral blood', *Immunol Invest*, 37(4), pp. 279-91.
- Mo, J. H., Park, S. W., Rhee, C. S., Takabayashi, K., Lee, S. S., Quan, S. H., Kim, I. S., Min, I. Y., Raz, E. and Lee, C. H. (2006) 'Suppression of allergic response by CpG motif oligodeoxynucleotide-house-dust mite conjugate in animal model of allergic rhinitis', *Am J Rhinol*, 20(2), pp. 212-8.
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. and O'Garra, A. (2001) 'Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor', *Annu Rev Immunol*, 19, pp. 683-765.
- Möthes, N., Heinzkill, M., Drachenberg, K. J., Sperr, W. R., Krauth, M. T., Majlesi, Y., Semper, H., Valent, P., Niederberger, V., Kraft, D. and Valenta, R. (2003) 'Allergen-specific immunotherapy with a monophosphoryl lipid A-adjuvanted vaccine: reduced seasonally boosted immunoglobulin E production and inhibition of basophil histamine release by therapy-induced blocking antibodies', *Clin Exp Allergy*, 33(9), pp. 1198-208.
- Möllerare, R., Elfman, L., Björnsson, E. and Stålenheim, G. (2000a) 'Changes in cytokine production in vitro during the early phase of birch-pollen immunotherapy', *Scand J Immunol*, 52(2), pp. 200-6.
- Möllerare, R., Elfman, L., Björnsson, E. and Stålenheim, G. (2000b) 'Cytokine production by peripheral blood mononuclear cells following birch-pollen immunotherapy', *Immunol Lett*, 73(1), pp. 51-6.

- Movérare, R., Rak, S. and Elfman, L. (1998) 'Allergen-specific increase in interleukin (IL)-4 and IL-5 secretion from peripheral blood mononuclear cells during birch-pollen immunotherapy', *Allergy*, 53(3), pp. 275-81.
- Movérare, R., Westritschnig, K., Svensson, M., Hayek, B., Bende, M., Pauli, G., Sorva, R., Haahtela, T., Valenta, R. and Elfman, L. (2002) 'Different IgE reactivity profiles in birch pollen-sensitive patients from six European populations revealed by recombinant allergens: an imprint of local sensitization', *Int Arch Allergy Immunol*, 128(4), pp. 325-35.
- Mullen, A. C., High, F. A., Hutchins, A. S., Lee, H. W., Villarino, A. V., Livingston, D. M., Kung, A. L., Cereb, N., Yao, T. P., Yang, S. Y. and Reiner, S. L. (2001) 'Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection', *Science*, 292(5523), pp. 1907-10.
- Muraille, E. and Leo, O. (1998) 'Revisiting the Th1/Th2 paradigm', *Scand J Immunol*, 47(1), pp. 1-9.
- Möbs, C., Ipsen, H., Mayer, L., Slotosch, C., Petersen, A., Würtzen, P. A., Hertl, M. and Pfützner, W. (2012) 'Birch pollen immunotherapy results in long-term loss of Bet v 1-specific TH2 responses, transient TR1 activation, and synthesis of IgE-blocking antibodies', *J Allergy Clin Immunol*, 130(5), pp. 1108-1116.e6.
- Möbs, C. and Schmidt, T. (2016) 'Research Techniques Made Simple: Monitoring of T-Cell Subsets using the ELISPOT Assay', *J Invest Dermatol*, 136(6), pp. e55-9.
- Möbs, C., Slotosch, C., Löffler, H., Jakob, T., Hertl, M. and Pfützner, W. (2010) 'Birch pollen immunotherapy leads to differential induction of regulatory T cells and delayed helper T cell immune deviation', *J Immunol*, 184(4), pp. 2194-203.
- Möbs, C., Slotosch, C., Löffler, H., Pfützner, W. and Hertl, M. (2008) 'Cellular and humoral mechanisms of immune tolerance in immediate-type allergy induced by specific immunotherapy', *Int Arch Allergy Immunol*, 147(3), pp. 171-8.
- Möller, C., Dreborg, S., Ferdousi, H. A., Halken, S., Høst, A., Jacobsen, L., Koivikko, A., Koller, D. Y., Niggemann, B., Norberg, L. A., Urbanek, R., Valovirta, E. and Wahn, U. (2002) 'Pollen immunotherapy reduces the development of asthma in children with seasonal rhinoconjunctivitis (the PAT-study)', *J Allergy Clin Immunol*, 109(2), pp. 251-6.
- Müller, U., Akdis, C. A., Fricker, M., Akdis, M., Blesken, T., Bettens, F. and Blaser, K. (1998) 'Successful immunotherapy with T-cell epitope peptides of bee venom phospholipase A2 induces specific T-cell anergy in patients allergic to bee venom', *J Allergy Clin Immunol*, 101(6 Pt 1), pp. 747-54.
- Niederberger, V., Pauli, G., Grönlund, H., Fröschl, R., Rumpold, H., Kraft, D., Valenta, R. and Spitzauer, S. (1998) 'Recombinant birch pollen allergens (rBet v 1 and rBet v 2) contain most of the IgE epitopes present in birch, alder, hornbeam, hazel, and oak pollen: a quantitative IgE inhibition study with sera from different populations', *J Allergy Clin Immunol*, 102(4 Pt 1), pp. 579-91.
- Nieminen, K., Laaksonen, K. and Savolainen, J. (2009) 'Three-year follow-up study of allergen-induced in vitro cytokine and signalling lymphocytic activation molecule mRNA responses in peripheral blood mononuclear cells of allergic rhinitis patients undergoing specific immunotherapy', *Int Arch Allergy Immunol*, 150(4), pp. 370-6.
- Noon, L. (1911) 'Prophylactic inoculation against hay fever', *The Lancet*, 177(4580), pp. 1572-1573.
- O'Brien, R. M., Byron, K. A., Varigos, G. A. and Thomas, W. R. (1997) 'House dust mite immunotherapy results in a decrease in Der p 2-specific IFN-gamma and IL-4 expression by circulating T lymphocytes', *Clin Exp Allergy*, 27(1), pp. 46-51.
- O'Garra, A., Barrat, F. J., Castro, A. G., Vicari, A. and Hawrylowicz, C. (2008) 'Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease', *Immunol Rev*, 223, pp. 114-31.

- O'Hehir, R. E., Gardner, L. M., de Leon, M. P., Hales, B. J., Biondo, M., Douglass, J. A., Rolland, J. M. and Sandrini, A. (2009) 'House dust mite sublingual immunotherapy: the role for transforming growth factor-beta and functional regulatory T cells', *Am J Respir Crit Care Med*, 180(10), pp. 936-47.
- Ozdemir, C., Akdis, M. and Akdis, C. A. (2009) 'T regulatory cells and their counterparts: masters of immune regulation', *Clin Exp Allergy*, 39(5), pp. 626-39.
- Pezzutto, A., Ulrichs, T. and Burmester, G. R. (2007) *Taschenatlas der Immunologie: Grundlagen, Diagnostik, Klinik*. 2. Auflage: Georg Thieme Verlag.
- Pfaar, O., Bachert, C., Bufe, A., Buhl, R., Ebner, C., Eng, P., Friedrichs, F., Fuchs, T., Hamelmann, E., Hartwig-Bade, D., Hering, T., Huttegger, I., Jung, K., Klimek, L., Kopp, M. V., Merk, H., Rabe, U., Saloga, J., Schmid-Grendelmeier, P., Schuster, A., Schwerk, N., Sitter, H., Umpfenbach, U., Wedi, B., Wöhr, S., Worm, M., Kleine-Tebbe, J., Kaul, S. and Schwalfenberg, A. (2014) 'Guideline on allergen-specific immunotherapy in IgE-mediated allergic diseases: S2k Guideline of the German Society for Allergology and Clinical Immunology (DGAKI), the Society for Pediatric Allergy and Environmental Medicine (GPA), the Medical Association of German Allergologists (AeDA), the Austrian Society for Allergy and Immunology (ÖGAI), the Swiss Society for Allergy and Immunology (SGAI), the German Society of Dermatology (DDG), the German Society of Oto- Rhino-Laryngology, Head and Neck Surgery (DGHNO-KHC), the German Society of Pediatrics and Adolescent Medicine (DGKJ), the Society for Pediatric Pneumology (GPP), the German Respiratory Society (DGP), the German Association of ENT Surgeons (BV-HNO), the Professional Federation of Paediatricians and Youth Doctors (BVKJ), the Federal Association of Pulmonologists (BDP) and the German Dermatologists Association (BVDD)', *Allergo J Int*, 23(8), pp. 282-319.
- Pfaar, O., van Twijver, E., Boot, J. D., Opstelten, D. J., Klimek, L., van Ree, R., Diamant, Z., Kuna, P. and Panzner, P. (2016) 'A randomized DBPC trial to determine the optimal effective and safe dose of a SLIT-birch pollen extract for the treatment of allergic rhinitis: results of a phase II study', *Allergy*, 71(1), pp. 99-107.
- Pilette, C., Nouri-Aria, K. T., Jacobson, M. R., Wilcock, L. K., Detry, B., Walker, S. M., Francis, J. N. and Durham, S. R. (2007) 'Grass pollen immunotherapy induces an allergen-specific IgA2 antibody response associated with mucosal TGF-beta expression', *J Immunol*, 178(7), pp. 4658-66.
- Platts-Mills, T. A. and Cooper, P. J. (2010) 'Differences in asthma between rural and urban communities in South Africa and other developing countries', *J Allergy Clin Immunol*, 125(1), pp. 106-7.
- Priault, G. and Nagler-Anderson, C. (2005) 'Mucosal immunity and allergic responses: lack of regulation and/or lack of microbial stimulation?', *Immunol Rev*, 206, pp. 204-18.
- Pschyrembel Klinisches Wörterbuch (2010). 262. neu bearb. Aufl.: de Gruyter, Berlin.
- Purello-D'Ambrosio, F., Gangemi, S., Merendino, R. A., Isola, S., Puccinelli, P., Parmiani, S. and Ricciardi, L. (2001) 'Prevention of new sensitizations in monosensitized subjects submitted to specific immunotherapy or not. A retrospective study', *Clin Exp Allergy*, 31(8), pp. 1295-302.
- Radulovic, S., Jacobson, M. R., Durham, S. R. and Nouri-Aria, K. T. (2008) 'Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4+ CD25+ cells in the nasal mucosa', *J Allergy Clin Immunol*, 121(6), pp. 1467-72, 1472.e1.
- Rak, S., Löwhagen, O. and Venge, P. (1988) 'The effect of immunotherapy on bronchial hyperresponsiveness and eosinophil cationic protein in pollen-allergic patients', *J Allergy Clin Immunol*, 82(3 Pt 1), pp. 470-80.

- Refaeli, Y., Van Parijs, L., Alexander, S. I. and Abbas, A. K. (2002) 'Interferon gamma is required for activation-induced death of T lymphocytes', *J Exp Med*, 196(7), pp. 999-1005.
- Rolland, J. M., Gardner, L. M. and O'Hehir, R. E. (2010) 'Functional regulatory T cells and allergen immunotherapy', *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 10(6), pp. 559-66.
- Romagnani, S. (1991) 'Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease', *Int J Clin Lab Res*, 21(2), pp. 152-8.
- Romagnani, S. (1994) 'Lymphokine production by human T cells in disease states', *Annu Rev Immunol*, 12, pp. 227-57.
- Romagnani, S. (2000) 'T-cell subsets (Th1 versus Th2)', *Ann Allergy Asthma Immunol*, 85(1), pp. 9-18; quiz 18, 21.
- Romagnani, S. (2006) 'Regulation of the T cell response', *Clin Exp Allergy*, 36(11), pp. 1357-66.
- Roncarolo, M. G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K. and Levings, M. K. (2006) 'Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans', *Immunol Rev*, 212, pp. 28-50.
- Rondón, C., Campo, P., Salas, M., Aranda, A., Molina, A., González, M., Galindo, L., Mayorga, C., Torres, M. J. and Blanca, M. (2016) 'Efficacy and safety of D. pteronyssinus immunotherapy in local allergic rhinitis: a double-blind placebo-controlled clinical trial', *Allergy*, 71(7), pp. 1057-61.
- Rosewich, M., Schulze, J., Eickmeier, O., Telles, T., Rose, M. A., Schubert, R. and Zielen, S. (2010) 'Tolerance induction after specific immunotherapy with pollen allergoids adjuvanted by monophosphoryl lipid A in children', *Clin Exp Immunol*, 160(3), pp. 403-10.
- Royer, B., Varadaradjalou, S., Saas, P., Guillosson, J. J., Kantelip, J. P. and Arock, M. (2001) 'Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10', *Clin Exp Allergy*, 31(5), pp. 694-704.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. and Toda, M. (1995) 'Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases', *J Immunol*, 155(3), pp. 1151-64.
- Sanderson, C. J. (1992) 'Interleukin-5, eosinophils, and disease', *Blood*, 79(12), pp. 3101-9.
- Satoguina, J. S., Weyand, E., Larbi, J. and Hoerauf, A. (2005) 'T regulatory-1 cells induce IgG4 production by B cells: role of IL-10', *J Immunol*, 174(8), pp. 4718-26.
- Savolainen, J., Laaksonen, K., Rantio-Lehtimäki, A. and Terho, E. O. (2004) 'Increased expression of allergen-induced in vitro interleukin-10 and interleukin-18 mRNA in peripheral blood mononuclear cells of allergic rhinitis patients after specific immunotherapy', *Clin Exp Allergy*, 34(3), pp. 413-9.
- Schandené, L., Alonso-Vega, C., Willems, F., Gérard, C., Delvaux, A., Velu, T., Devos, R., de Boer, M. and Goldman, M. (1994) 'B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10', *J Immunol*, 152(9), pp. 4368-74.
- Schulten, V., Tripple, V., Sidney, J., Greenbaum, J., Frazier, A., Alam, R., Broide, D., Peters, B. and Sette, A. (2014) 'Association between specific timothy grass antigens and changes in TH1- and TH2-cell responses following specific immunotherapy', *J Allergy Clin Immunol*, 134(5), pp. 1076-83.
- Schwartz, R. H. (2003) 'T cell anergy', *Annu Rev Immunol*, 21, pp. 305-34.
- Secrist, H., Chelen, C. J., Wen, Y., Marshall, J. D. and Umetsu, D. T. (1993) 'Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals', *J Exp Med*, 178(6), pp. 2123-30.
- Secrist, H., DeKruyff, R. H. and Umetsu, D. T. (1995) 'Interleukin 4 production by CD4+ T cells from allergic individuals is modulated by antigen concentration and antigen-presenting cell type', *J Exp Med*, 181(3), pp. 1081-9.

- Shim, J. Y., Kim, B. S., Cho, S. H., Min, K. U. and Hong, S. J. (2003) 'Allergen-specific conventional immunotherapy decreases immunoglobulin E-mediated basophil histamine releasability', *Clin Exp Allergy*, 33(1), pp. 52-7.
- Sly, R. M. (1999) 'Changing prevalence of allergic rhinitis and asthma', *Ann Allergy Asthma Immunol*, 82(3), pp. 233-48; quiz 248-52.
- Suárez-Fueyo, A., Ramos, T., Galán, A., Jimeno, L., Wurtzen, P. A., Marin, A., de Frutos, C., Blanco, C., Carrera, A. C., Barber, D. and Varona, R. (2014) 'Grass tablet sublingual immunotherapy downregulates the TH2 cytokine response followed by regulatory T-cell generation', *J Allergy Clin Immunol*, 133(1), pp. 130-8.e1-2.
- Szabo, S. J., Sullivan, B. M., Peng, S. L. and Glimcher, L. H. (2003) 'Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses', *Annu Rev Immunol*, 21, pp. 713-58.
- Söderlund, A., Gabrielsson, S., Paulie, S., Hammarström, M. L., Rak, S. and Troye-Blomberg, M. (1997) 'Allergen induced cytokine profiles in type I allergic individuals before and after immunotherapy', *Immunol Lett*, 57(1-3), pp. 177-81.
- Tanguay, S. and Killion, J. J. (1994) 'Direct comparison of ELISPOT and ELISA-based assays for detection of individual cytokine-secreting cells', *Lymphokine Cytokine Res*, 13(4), pp. 259-63.
- Tassignon, J., Burny, W., Dahmani, S., Zhou, L., Stordeur, P., Byl, B. and De Groote, D. (2005) 'Monitoring of cellular responses after vaccination against tetanus toxoid: comparison of the measurement of IFN-gamma production by ELISA, ELISPOT, flow cytometry and real-time PCR', *J Immunol Methods*, 305(2), pp. 188-98.
- Taylor, A., Verhagen, J., Blaser, K., Akdis, M. and Akdis, C. A. (2006) 'Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells', *Immunology*, 117(4), pp. 433-42.
- Teixeira, L. K., Fonseca, B. P., Barboza, B. A. and Viola, J. P. (2005) 'The role of interferon-gamma on immune and allergic responses', *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100 Suppl 1, pp. 137-44.
- Thunberg, S., Akdis, M., Akdis, C. A., Grönneberg, R., Malmström, V., Trollmo, C., van Hage, M. and Gafvelin, G. (2007) 'Immune regulation by CD4+CD25+ T cells and interleukin-10 in birch pollen-allergic patients and non-allergic controls', *Clin Exp Allergy*, 37(8), pp. 1127-36.
- Till, S., Walker, S., Dickason, R., Huston, D., O'Brien, F., Lamb, J., Kay, A. B., Corrigan, C. and Durham, S. (1997) 'IL-5 production by allergen-stimulated T cells following grass pollen immunotherapy for seasonal allergic rhinitis', *Clin Exp Immunol*, 110(1), pp. 114-21.
- Torgerson, T. R. (2006) 'Regulatory T cells in human autoimmune diseases', *Springer Semin Immunopathol*, 28(1), pp. 63-76.
- Treter, S. and Luqman, M. (2000) 'Antigen-specific T cell tolerance down-regulates mast cell responses in vivo', *Cell Immunol*, 206(2), pp. 116-24.
- Valenta, R. and Niederberger, V. (2007) 'Recombinant allergens for immunotherapy', *J Allergy Clin Immunol*, 119(4), pp. 826-30.
- Van Overtvelt, L., Wambre, E., Maillère, B., von Hofe, E., Louise, A., Balazuc, A. M., Bohle, B., Ebo, D., Leboulle, C., Garcia, G. and Moingeon, P. (2008) 'Assessment of Bet v 1-specific CD4+ T cell responses in allergic and nonallergic individuals using MHC class II peptide tetramers', *J Immunol*, 180(7), pp. 4514-22.
- Van Ree, R., Van Leeuwen, W. A., Dieges, P. H., Van Wijk, R. G., De Jong, N., Brewczynski, P. Z., Kroon, A. M., Schilte, P. P., Tan, K. Y., Simon-Licht, I. F., Roberts, A. M., Stapel, S. O. and Aalberse, R. C. (1997) 'Measurement of IgE antibodies against purified grass pollen allergens (Lol p 1, 2, 3 and 5) during immunotherapy', *Clin Exp Allergy*, 27(1), pp. 68-74.

- Vandenbark, A. A., Barnes, D., Finn, T., Bourdette, D. N., Whitham, R., Robey, I., Kaleeba, J., Bebo, B. F., Miller, S. D., Offner, H. and Chou, Y. K. (2000) 'Differential susceptibility of human T(h)1 versus T(h) 2 cells to induction of anergy and apoptosis by ECDI/antigen-coupled antigen-presenting cells', *Int Immunol*, 12(1), pp. 57-66.
- Vanek-Krebitz, M., Hoffmann-Sommergruber, K., Laimer da Camara Machado, M., Susani, M., Ebner, C., Kraft, D., Scheiner, O. and Breiteneder, H. (1995) 'Cloning and sequencing of Mal d 1, the major allergen from apple (*Malus domestica*), and its immunological relationship to Bet v 1, the major birch pollen allergen', *Biochem Biophys Res Commun*, 214(2), pp. 538-51.
- Venkataraman, C., Leung, S., Salvekar, A., Mano, H. and Schindler, U. (1999) 'Repression of IL-4-induced gene expression by IFN-gamma requires Stat1 activation', *J Immunol*, 162(7), pp. 4053-61.
- Vignali, D. A., Collison, L. W. and Workman, C. J. (2008) 'How regulatory T cells work', *Nat Rev Immunol*, 8(7), pp. 523-32.
- Vukmanovic-Stejic, M., Zhang, Y., Cook, J. E., Fletcher, J. M., McQuaid, A., Masters, J. E., Rustin, M. H., Taams, L. S., Beverley, P. C., Macallan, D. C. and Akbar, A. N. (2006) 'Human CD4⁺ CD25^{hi} Foxp3⁺ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo', *J Clin Invest*, 116(9), pp. 2423-33.
- Wachholz, P. A. and Durham, S. R. (2004) 'Mechanisms of immunotherapy: IgG revisited', *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 4(4), pp. 313-8.
- Wachholz, P. A., Nouri-Aria, K. T., Wilson, D. R., Walker, S. M., Verhoef, A., Till, S. J. and Durham, S. R. (2002) 'Grass pollen immunotherapy for hayfever is associated with increases in local nasal but not peripheral Th1:Th2 cytokine ratios', *Immunology*, 105(1), pp. 56-62.
- Walker, S. M., Varney, V. A., Gaga, M., Jacobson, M. R. and Durham, S. R. (1995) 'Grass pollen immunotherapy: efficacy and safety during a 4-year follow-up study', *Allergy*, 50(5), pp. 405-13.
- Wambre, E., DeLong, J. H., James, E. A., LaFond, R. E., Robinson, D. and Kwok, W. W. (2012) 'Differentiation stage determines pathologic and protective allergen-specific CD4⁺ T-cell outcomes during specific immunotherapy', *J Allergy Clin Immunol*, 129(2), pp. 544-51, 551.e1-7.
- Wambre, E., DeLong, J. H., James, E. A., Torres-Chinn, N., Pfützner, W., Möbs, C., Durham, S. R., Till, S. J., Robinson, D. and Kwok, W. W. (2014) 'Specific immunotherapy modifies allergen-specific CD4(+) T-cell responses in an epitope-dependent manner', *J Allergy Clin Immunol*, 133(3), pp. 872-9.e7.
- Wilson, D. R., Irani, A. M., Walker, S. M., Jacobson, M. R., Mackay, I. S., Schwartz, L. B. and Durham, S. R. (2001a) 'Grass pollen immunotherapy inhibits seasonal increases in basophils and eosinophils in the nasal epithelium', *Clin Exp Allergy*, 31(11), pp. 1705-13.
- Wilson, D. R., Nouri-Aria, K. T., Walker, S. M., Pajno, G. B., O'Brien, F., Jacobson, M. R., Mackay, I. S. and Durham, S. R. (2001b) 'Grass pollen immunotherapy: symptomatic improvement correlates with reductions in eosinophils and IL-5 mRNA expression in the nasal mucosa during the pollen season', *J Allergy Clin Immunol*, 107(6), pp. 971-6.
- Zeng, G., Zheng, P., Luo, W., Huang, H., Wei, N. and Sun, B. (2016) 'Longitudinal profiles of serum specific IgE and IgG4 to *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen and its major components during allergen immunotherapy in a cohort of southern Chinese children', *Mol Immunol*, 74, pp. 1-9.

7 Tabellarischer Anhang

Allergiker unter SIT

IL-5	m0			m1			m3		
	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ
P2	0,00	1,17	0,00	0,00	0,00	0,00	17,00	0,00	17,00
P5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	105,75	2,36	103,39
P8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P10	822,63	68,77	753,86	987,63	1020,34	0,00	431,49	50,20	381,29
P11	475,91	5,63	470,28	190,91	9,91	181,00	67,77	0,00	67,77
P12	0,00	0,00	0,00	0,52	0,00	0,52	0,00	0,00	0,00
P13	160,14	0,00	160,14	50,36	61,27	0,00	107,41	0,00	107,41
P14	193,09	0,14	192,95	324,45	14,23	310,22	154,23	0,00	154,23
P16	1088,37	45,59	1042,78	16,89	0,00	16,89	108,56	0,00	108,56
P18	0,00	0,00	0,00	38,46	46,17	0,00	6,38	0,00	6,38

IL-5	m6			m12			m18		
	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ
P2	4,92	0,00	4,92	108,25	0,00	108,25	(-)	(-)	(-)
P5	493,35	0,00	493,35	303,06	0,00	303,06	227,47	0,00	227,47
P6	15,93	0,00	15,93	8,96	0,00	8,96	55,57	0,00	55,57
P8	113,25	0,00	113,25	14,86	0,00	14,86	0,00	0,00	0,00
P10	128,49	0,49	128,00	48,63	0,00	48,63	374,34	0,00	374,34
P11	37,20	0,00	37,20	1,49	0,00	1,49	31,77	0,00	31,77
P12	3,12	0,00	3,12	0,00	0,00	0,00	(-)	(-)	(-)
P13	1021,05	10,36	1010,69	1067,41	70,82	996,59	520,59	0,00	520,59
P14	233,77	0,00	233,77	256,50	37,41	219,09	818,77	91,50	727,27
P16	160,22	0,00	160,22	8,93	0,00	8,93	68,74	0,00	68,74
P18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

IL-5	m24			m30			m36		
	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ
P2	66,38	0,00	66,38	126,79	0,00	126,79	0,00	0,00	0,00
P5	298,35	41,59	256,76	50,71	0,00	50,71	10,71	0,00	10,71
P6	0,00	0,00	0,00	11,46	0,00	11,46	17,00	0,00	17,00
P8	2,00	0,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P10	802,91	121,91	681,00	65,91	0,00	65,91	31,63	0,00	31,63
P11	10,34	0,00	10,34	3,20	0,00	3,20	54,06	0,00	54,06
P12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	(-)	(-)	(-)
P13	124,91	0,00	124,91	104,68	0,00	104,68	142,64	0,00	142,64
P14	202,18	0,00	202,18	369,45	114,68	254,77	244,91	4,00	240,91
P16	3,74	0,00	3,74	65,22	0,00	65,22	2,26	0,00	2,26
P18	0,00	0,00	0,00	19,45	7,64	11,81	1,27	2,64	0,00

IFNy	m0			m1			m3		
	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ
P2	0,00	12,74	0,00	185,50	48,92	136,58	0,00	0,00	0,00
P5	70,35	189,39	0,00	99,06	104,87	0,00	50,52	88,90	0,00
P6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	24,83	38,40	0,00
P8	33,67	29,29	4,38	23,04	11,58	11,46	5,96	3,46	2,50
P10	967,70	85,33	882,37	923,70	593,20	330,50	875,20	5,45	869,75
P11	138,08	6,70	131,38	0,00	0,82	0,00	0,00	0,00	0,00
P12	176,49	0,00	176,49	219,49	2,77	216,72	0,00	0,00	0,00
P13	10,89	0,00	10,89	3,73	21,70	0,00	0,00	47,92	0,00
P14	0,00	0,00	0,00	107,70	0,00	107,70	26,70	32,33	0,00
P16	237,20	69,83	167,37	0,00	2,45	0,00	36,83	0,00	36,83
P18	11,55	6,82	4,74	45,37	41,42	3,95	0,00	0,00	0,00

IFNy	m6			m12			m18		
	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ
P2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	(-)	(-)	(-)
P5	99,55	86,32	13,23	49,23	21,65	27,58	56,00	52,77	3,23
P6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P8	31,17	31,38	0,00	63,88	25,54	38,34	25,75	15,75	10,00
P10	305,33	78,20	227,13	513,83	136,45	377,38	78,08	31,45	46,63
P11	45,33	0,00	45,33	34,08	0,00	34,08	20,70	0,00	20,70
P12	130,49	131,77	0,00	22,49	0,00	22,49	(-)	(-)	(-)
P13	34,27	41,97	0,00	43,05	0,00	43,05	39,27	1,57	37,70
P14	142,20	83,70	58,50	141,45	104,70	36,75	220,20	23,70	196,50
P16	0,00	20,58	0,00	14,33	0,00	14,33	2,45	0,00	2,45
P18	0,00	16,82	0,00	9,45	10,76	0,00	0,00	13,26	0,00

IFNy	m24			m30			m36		
	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ
P2	1,16	0,00	1,16	10,11	6,95	3,16	0,00	0,00	0,00
P5	315,03	150,19	164,84	65,52	58,58	6,94	63,58	12,29	51,29
P6	0,00	0,00	0,00	4,12	0,00	4,12	0,00	0,00	0,00
P8	37,21	18,88	18,33	20,96	26,17	0,00	43,88	31,17	12,71
P10	390,08	24,58	365,50	17,58	27,95	0,00	170,70	0,00	170,70
P11	21,08	39,58	0,00	21,20	0,00	21,20	0,00	15,08	0,00
P12	1,91	9,63	0,00	0,00	0,00	0,00	(-)	(-)	(-)
P13	0,35	38,59	0,00	5,35	20,62	0,00	4,41	0,00	4,41
P14	51,08	79,58	0,00	47,45	52,45	0,00	29,83	26,83	3,00
P16	5,58	0,00	5,58	0,00	0,00	0,00	19,58	53,95	0,00
P18	0,24	3,13	0,00	22,51	37,13	0,00	0,00	0,00	0,00

IL-10	m0			m1			m3		
	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ
P2	7,08	2,08	5,00	90,48	27,08	63,40	40,08	22,68	17,40
P5	100,68	9,28	91,40	61,28	3,08	58,20	37,88	1,48	36,40
P6	225,79	101,58	124,21	46,84	0,00	46,84	101,05	28,16	72,89
P8	11,48	4,96	6,52	0,17	13,22	0,00	0,00	0,00	0,00
P10	72,13	22,13	50,00	80,39	28,00	52,39	33,65	7,13	26,52
P11	22,63	0,00	22,63	24,63	21,80	2,83	10,97	0,13	10,84
P12	83,28	10,68	72,60	139,88	16,48	123,40	70,88	28,48	42,40
P13	57,13	16,13	41,00	30,97	0,00	30,97	136,63	25,30	111,33
P14	42,16	0,00	42,16	63,09	19,50	43,59	22,16	0,00	22,16
P16	191,53	110,75	80,78	287,31	162,16	125,15	180,44	89,03	91,41
P18	154,21	25,00	129,21	456,32	336,58	119,74	41,05	23,68	17,37

IL-10	m6			m12			m18		
	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ
P2	0,00	0,08	0,00	23,68	5,68	18,00	(-)	(-)	(-)
P5	65,48	6,48	59,00	16,28	1,48	14,80	127,88	81,28	46,60
P6	176,84	22,37	154,47	31,05	3,95	27,10	97,11	66,32	30,79
P8	58,87	42,78	16,09	14,52	8,65	5,87	81,91	21,04	60,87
P10	85,83	19,96	65,87	312,35	164,96	147,39	152,78	91,70	61,08
P11	15,30	7,80	7,50	21,97	0,00	21,97	38,97	42,47	0,00
P12	395,68	178,08	217,60	201,28	148,88	52,40	(-)	(-)	(-)
P13	104,13	0,00	104,13	92,63	24,63	68,00	38,13	0,00	38,13
P14	127,31	13,25	114,06	240,13	120,75	119,38	119,97	40,13	79,84
P16	220,44	163,88	56,56	239,34	191,53	47,81	122,00	74,66	47,34
P18	350,53	272,37	78,16	220,79	143,68	77,11	117,37	90,79	26,58

IL-10	m24			m30			m36		
	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ
P2	31,48	15,08	16,40	29,68	17,28	12,40	22,88	16,28	6,60
P5	157,48	85,08	72,40	312,68	263,28	49,40	130,88	24,88	106,00
P6	36,58	24,21	12,37	168,16	86,84	81,32	132,11	85,79	46,32
P8	18,00	21,70	0,00	21,91	3,00	18,91	23,65	5,39	18,26
P10	150,61	89,74	60,87	78,87	37,78	41,09	29,96	20,61	9,35
P11	35,63	44,47	0,00	35,13	8,63	26,50	2,30	6,80	0,00
P12	160,28	89,28	71,00	122,48	68,08	54,40	(-)	(-)	(-)
P13	80,63	28,30	52,33	345,13	199,47	145,66	57,63	8,30	49,33
P14	16,84	0,00	16,84	32,63	2,94	29,69	54,50	2,00	52,50
P16	53,09	2,63	50,46	69,81	4,81	65,00	88,72	20,91	67,81
P18	243,95	322,37	0,00	75,70	37,53	38,17	61,20	16,87	44,33

TGF- β Tag 3	m0			m1			m3		
	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ
P2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P12	1365,00	0,00	1365,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P14	860,00	0,00	860,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

TGF- β Tag 3	m6			m12			m18		
	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ
P2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	(-)	(-)	(-)
P5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1466,00	2016,00	0,00
P12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	(-)	(-)	(-)
P13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P14	0,00	893,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

TGF- β Tag 3	m24			m30			m36		
	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ
P2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P11	976,00	186,00	790,00	2046,00	826,00	1220,00	2516,00	146,00	2370,00
P12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	(-)	(-)	(-)
P13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P14	448,89	0,00	448,89	0,00	0,00	0,00	471,11	271,11	200,00
P16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P18	0,00	0,00	0,00	847,14	997,14	0,00	3782,86	2775,71	1007,14

TGF- β Tag 7	m0			m1			m3		
	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ
P2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P12	1231,67	0,00	1231,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P14	0,00	487,78	0,00	0,00	1076,67	0,00	0,00	0,00	0,00
P16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

TGF- β Tag 7	m6			m12			m18		
	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ
P2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	(-)	(-)	(-)
P5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	984,00	0,00	984,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P8	662,86	0,00	662,86	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P11	0,00	0,00	0,00	2026,00	2826,00	0,00	2216,00	2496,00	0,00
P12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	(-)	(-)	(-)
P13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P14	0,00	1260,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	121,11	0,00
P16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

TGF- β Tag 7	m24			m30			m36		
	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ
P2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P8	1412,86	0,00	1412,86	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P11	496,00	3146,00	0,00	0,00	446,00	0,00	156,00	646,00	0,00
P12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	(-)	(-)	(-)
P13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P14	0,00	126,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P16	0,00	41,43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P18	0,00	0,00	0,00	1868,57	4247,14	0,00	0,00	0,00	0,00

Allergiker

IL-5	außerhalb der Saison			innerhalb der Saison		
	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ
FG	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
WP	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
IW	215,15	0,00	215,15	206,69	7,27	199,42
LD	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
NS	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HW	0,00	0,00	0,00	32,27	0,00	32,27
RK	0,00	0,00	0,00	47,85	0,00	47,85
CB	282,85	0,00	282,85	177,65	0,00	177,65

IFNy	außerhalb der Saison			innerhalb der Saison		
	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ
FG	275,08	269,95	5,14	9,41	0,00	9,41
WP	0,00	0,00	0,00	0,00	1,16	0,00
IW	74,00	0,00	74,00	25,22	0,00	25,22
LD	0,00	0,00	0,00	0,00	14,14	0,00
NS	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HW	0,00	0,00	0,00	0,00	6,70	0,00
RK	96,97	24,00	72,97	869,27	656,43	212,84
CB	74,54	48,86	25,68	6,97	49,81	0,00

IL-10	außerhalb der Saison			innerhalb der Saison		
	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ
FG	665,92	500,15	165,77	122,46	46,31	76,15
WP	125,54	60,54	65,00	662,85	643,62	19,23
IW	535,92	415,92	120,00	565,54	392,08	173,46
LD	354,77	58,62	296,15	808,62	646,69	161,92
NS	27,85	1,69	26,15	454,00	320,92	133,08
HW	75,92	28,23	47,69	377,46	217,85	159,62
RK	312,46	124,00	188,46	801,31	677,85	123,46
CB	254,38	40,54	213,85	342,85	141,31	201,54

TGF- β Tag 3	außerhalb der Saison			innerhalb der Saison		
	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ
FG	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
WP	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
IW	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
LD	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
NS	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HW	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
RK	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CB	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

TGF- β Tag 7	außerhalb der Saison			innerhalb der Saison		
	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ
FG	0,00	0,00	0,00	1452,00	0,00	1452,00
WP	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
IW	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
LD	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
NS	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HW	171,67	2380,00	0,00	655,00	480,00	175,00
RK	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CB	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Nicht-Allergiker

IL-5	außerhalb der Saison			innerhalb der Saison		
	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ
K1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

IFN γ	außerhalb der Saison			innerhalb der Saison		
	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ
K1	15,55	0,00	15,55	362,26	329,11	33,16
K2	20,29	15,68	4,61	13,05	37,00	0,00
K3	236,74	37,92	198,82	89,63	66,21	23,42
K4	107,66	138,58	0,00	90,03	150,16	0,00
K5	299,63	195,03	104,61	154,11	95,82	58,29
K6	5,42	1,74	3,68	8,32	36,61	0,00
K7	28,18	16,08	12,11	324,24	342,66	0,00
K8	21,47	29,63	0,00	23,97	22,13	1,84

IL-10	außerhalb der Saison			innerhalb der Saison		
	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ
K1	141,93	6,37	135,56	562,48	444,52	117,96
K2	114,89	51,19	63,70	190,63	125,81	64,81
K3	194,33	86,74	107,59	112,30	4,15	108,15
K4	41,93	19,89	22,04	74,33	37,85	36,48
K5	163,96	48,04	115,93	222,67	253,04	0,00
K6	68,96	0,00	68,96	0,00	0,00	0,00
K7	164,70	17,67	147,04	126,37	69,70	56,67
K8	123,59	20,63	102,96	378,04	390,07	0,00

TGF- β Tag 3	außerhalb der Saison			innerhalb der Saison		
	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ
K1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

TGF- β Tag 7	außerhalb der Saison			innerhalb der Saison		
	Bet v 1	us	Δ	Bet v 1	us	Δ
K1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Allergiker unter SIT

Hautreaktion im Pricktest

Pricktest	m0	m12	m24	m36
P2	1	0,5	0,5	1
P5	2	1	1	1
P6	3	1	1	1
P8	2	1	0,5	0,5
P10	2	2	1	(-)
P11	2	1	1	0,5
P12	2	2	(-)	(-)
P13	2	1	1	1
P14	2	1	1	1
P16	3	1	1	1
P18	2	1	1	1

Schweregrad der allergischen Erkrankung (*clinical score*)

<i>clinical score</i>	m -6	m1	m3	m6	m12	m18	m24	m30	m36
P2	3	3	3	4	1	1	3	1	2
P5	4	4	1	4	1	3	5	5	3
P6	4	4	4	3	1	2	4	3	3
P8	5	1	1	1	1	1	1	3	1
P10	5	1	1	3	3	1	1	1	1
P11	4	1	4	3	4	1	1	1	1
P12	4	2	1	2	5	4	1	3	(-)
P13	5	1	1	5	5	2	2	5	4
P14	5	1	2	3	3	4	2	4	1
P16	4	1	3	5	6	4	6	4	1
P18	4	4	4	5	1	3	1	3	1

AllergikerSchweregrad der allergischen Erkrankung (*clinical score*)

<i>clinical score</i>	innerhalb der Saison	innerhalb der Saison
FG	6	5
WP	3	3
IW	6	4
LD	3	4
NS	6	3
HW	3	4
RK	(---)	(---)
CB	4	5

8 Schriftenverzeichnis

Originalarbeit

Christian Möbs, Henrik Ipsen, Lea Mayer, Caroline Slotosch, Arnd Petersen, Peter A. Würtzen, Michael Hertl, Wolfgang Pfützner

Birch pollen immunotherapy results in long-term loss of Bet v 1-specific Th2 responses, transient Tr1 activation and synthesis of IgE-blocking antibodies. 2012; J Allergy Clin Immunol, 130(5):1108-1116

Publizierte Abstracts und Kongressbeiträge

Christian Möbs, Lea Mayer, Michael Hertl, Wolfgang Pfützner

Dynamische Immunantwort unter spezifischer Immuntherapie: Differentielle Zytokinprofile peripherer mononukleärer Zellen im Rahmen einer 3-jährigen Toleranzinduktion gegenüber Birkenpollen. 2011; - 23. Mainzer Allergie-Workshop, Mainz

Christian Möbs, Lea Mayer, Michael Hertl, Wolfgang Pfützner

Bet v 1-specific cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells over a 3-year period of specific immunotherapy. 2011; Allergy, 66 Suppl 94:S724 (P1924) – XXX. Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) 2011, Istanbul, Türkei

Christian Möbs, Lea Mayer, Michael Hertl, Wolfgang Pfützner

Dynamische Immunantwort unter spezifischer Immuntherapie: Differentielle Zytokinprofile peripherer mononukleärer Zellen im Rahmen einer 3-jährigen Toleranzinduktion gegenüber Birkenpollen. 2011; – 6. Deutscher Allergiekongress 2011, Wiesbaden

Christian Möbs, Lea Mayer, Caroline Slotosch, Michael Hertl, Wolfgang Pfützner

Specific immunotherapy (SIT) results in differential cellular and humoral immune responses leading to sustained induction of allergen tolerance. 2010; – 5. Deutscher Allergiekongress 2010, Hannover

Christian Möbs, Lea Mayer, Michael Hertl and Wolfgang Pfützner

Allergen tolerance is established by differentiated cellular and humoral immune responses: results of a longitudinal study in birch pollen allergics treated by specific immunotherapy. 2010; Allergy, 65 Suppl 92:S714 (P1942) – XXIX. Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) 2010, London, Großbritannien

Christian Möbs, Lea Mayer, Caroline Slotosch, Michael Hertl, Wolfgang Pfützner

Induction of allergen tolerance by differentiated cellular and humoral immune responses in birch pollen allergic patients treated by specific immunotherapy. 2010; J Invest Dermatol, 130 Suppl 2:S41 (P242) – 40th Annual European Society for Dermatological Research (ESDR) Meeting 2010, Helsinki, Finnland

9 Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren
Professoren, Doktoren und Dozenten in Marburg:

Adamkiewicz, Aumüller, Austermann, Buch, Cetin, Coca, Czubayko, Dibbets, Eckhorn, Ehlenz, Eilers, Feuser, Flores-de-Jacoby, Gente, Glörfeld, Grundmann, Hilt, Höffken, Käuser, Kroh, Lehmann, Lill, Löffler, Lotzmann, Mandrek, Mengel, Mittag, Momeni-Jablonski, Müller, Mutters, Neff, Nonnenmacher, Pancherz, Pieper, Pflüger, Plant, Richter, Röper, Roeßler, Ramaswamy, Schmidt, Seitz, Sesterhenn, Sonntag, Stachniss, Stelzel, Stiletto, Stoll, Storch, Sundermeyer, Suske, Tebbe, Teymoortash, Wagner, Wennemuth, Weihe, Werner, Wilhelm

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. M. Hertl	für die Möglichkeit, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen.
--------------------	---

Prof. Dr. W. Pfützner	für die Überlassung dieses interessanten Themas, die hervorragende Unterstützung und Betreuung sowie für die konstruktive Kritik und Diskussionsanregungen bei der Fertigstellung der Dissertation.
-----------------------	---

Dr. C. Möbs	für die außerordentlich gute Betreuung meiner Arbeit, die stets unkomplizierte Zusammenarbeit, die zahlreichen Ratschläge und die unermüdliche Bereitschaft und Geduld bei der Beantwortung meiner Fragen.
-------------	--

Mein Dank geht auch an die Mitarbeiter der Dermatologischen Forschungsabteilung des BMFZ für die Hilfe und Beantwortung von Fragen bei den labormedizinischen Untersuchungen.

Des Weiteren möchte ich mich bei den ärztlichen und technischen Mitarbeitern der Hautklinik Marburg für die Rekrutierung der Patienten, die Blutentnahmen und die Erhebung der klinischen Parameter bedanken.

Ein besonderer Dank gilt den Patienten der Hautklinik Marburg, die sich bereit erklärt haben an dieser Studie teilzunehmen und somit die Entstehung dieser Arbeit erst ermöglicht haben.

Abschließend danke ich meiner Mutter für das Vertrauen in mich, die tatkräftige Unterstützung und die gute Motivationsarbeit. Gerne möchte ich ihr diese Arbeit widmen.